

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
BIOQUÍMICA

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA LONGA
HIDROXILADA ACUMULADOS NAS DEFICIÊNCIAS DA DESIDROGENASE DE
HIDROXIACIL-COA DE CADEIA LONGA E DA PROTEÍNA TRIFUNCIONAL
MITOCONDRIAL SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E
HOMEOSTASE MITOCONDRIAL EM CÉREBRO DE RATOS JOVENS**

ANELISE MIOTTI TONIN

ORIENTADOR: Prof. Dr. MOACIR WAJNER

CO-ORIENTARORA: Prof^a. Dr^a. PATRÍCIA F. SCHUCK

Porto Alegre, 2010

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por me proporcionar uma formação gratuita e de qualidade.

Ao meu orientador, Professor Moacir Wajner, pelo carinho, pela paciência e pelo incentivo.

À minha família do laboratório 38 por serem pessoas maravilhosas, e à todos aqueles que já passaram por esse laboratório e deixaram muita saudade.

À minha primeira “chefinha” e co-orientadora Patrícia por todos os ensinamentos bioquímicos, toda ajuda e por toda a amizade.

Ao meu amigão Gustavo, por toda ajuda e por sua amizade.

À Carolina, por ser uma pessoa adorável, por todo o carinho, toda a ajuda.

Aos meus “queridinhos” Guilhian e César pelo imenso carinho todos esses anos.

Ao Mateus, cuja ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos mestrandos Estela, Carolina, Alexandre e Bianca por colaborarem com este trabalho e por sua amizade.

Aos bolsistas Alana, Luaciana, Ângela, Lisiane e Duda por estarem sempre prontos a ajudar e por toda a amizade.

Aos meus pais e à minha irmã, por todo amor e entenderem a importância de meu mestrado.

Ao Douglas, por todo amor, por toda a compreensão e por tornar minha vida mais feliz.

SUMÁRIO

PARTE I	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
I.1.INTRODUÇÃO	6
I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo	6
I.1.2. Defeitos de Oxidação de Ácidos Graxos	7
I.1.3. Deficiência da proteína trifuncional mitocondrial (MTP) e da Desidrogenase de 3-hidroxiacil-CoA de Cadeia longa (LCHAD).....	9
I.1.3.1. Metabólitos Acumulados nos Pacientes com Deficiência da LCHAD e da MTP	12
I.1.3.2. Aspectos moleculares das deficiência de LCHAD/MTP	13
I.1.3.3. Fisiopatologia nas Deficiências LCHAD/MTP.....	14
I.1.4. Fosforilação Oxidativa e Homeostase Mitocondrial.....	16
I.1.5. Radicais Livres	22
I.1.5.1. Defesas Antioxidantes.....	24
I.1.5.2. Estresse Oxidativo.....	25
I.1.5.3. Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas	26
I.2.OBJETIVOS.....	29
I.2.1. Objetivo Geral	29
I.2.2. Objetivos Específicos	29

PARTE II	31
Capítulo I	32
Capítulo II	67
PARTE III	96
III.1.DISSCUSSÃO.....	97
III.2.CONCLUSÕES.....	106
III.3.PERSPECTIVAS	109
III.4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110

PARTE I

Introdução e Objetivos

RESUMO

As deficiências da proteína trifuncional mitocondrial (MTP) e da desidrogenase de acil-CoA de cadeia longa hidroxilada (LCHAD) são defeitos hereditários da β -oxidação de ácidos graxos. Pacientes afetados por essas deficiências apresentam acúmulo de 3-hidroxiácidos de cadeia longa, como os ácidos 3-hidroxidodecanóico (3HDA), 3-hidroxitetradecanóico (3HTA) e 3-hidroxi palmítico (3HPA) em tecidos e líquidos biológicos. A apresentação clínica é caracterizada por encefalopatia com coma, letargia, convulsão, retardo mental e hipotonia, além de disfunção hepática, cardiomiopatia, fraqueza muscular e retinopatia. Considerando que a fisiopatologia dos sintomas neurológicos dessas doenças ainda não está bem estabelecida e que tem sido levantada a hipótese de que os ácidos graxos acumulados nessas doenças possam exercer efeitos tóxicos, o presente trabalho se propôs a investigar os efeitos *in vitro* dos ácidos 3HDA, 3HTA e 3HPA sobre parâmetros de estresse oxidativo e da homeostase mitocondrial em cérebro de ratos de 30 dias de vida. Inicialmente, observamos que o 3HDA, 3HTA e 3HPA induziram um aumento na peroxidação lipídica evidenciado por um aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Os ácidos 3HTA e 3HPA também causaram dano oxidativo proteico, visto que aumentaram o conteúdo de carbonilas e diminuíram o conteúdo de grupamentos sulfidríla. Além disso, 3HTA e 3HPA diminuíram os níveis de glutathiona reduzida (GSH), o principal antioxidante não-enzimático presente no cérebro, sem no entanto, alterar a produção de nitratos e nitritos. O ácido 3HTA apresentou o efeito mais pronunciado nos parâmetros testados e a adição dos antioxidantes e sequestradores de radicais livres trolox e deferoxamina (DFO) foram capazes de prevenir parcialmente o dano oxidativo lipídico, ao passo que DFO preveniu totalmente a redução dos níveis de GSH. Além disso, os ácidos 3HDA, 3HTA e 3HPA aumentaram o estado 4 da respiração mitocondrial e diminuíram os valores do índice de controle respiratório. 3HTA e 3HPA também diminuíram o potencial de membrana e o conteúdo de equivalentes reduzidos de NAD(P)H na matriz mitocondrial, sugerindo um efeito desacoplador da fosforilação oxidativa. Além disso, o 3HTA diminuiu o estado 3 da respiração e a razão ADP/O quando utilizado glutamato/malato como substrato, mas não quando utilizado piruvato/malato ou succinato como substratos, sugerindo que o transporte de glutamato e/ou sua oxidação possam estar sendo inibidos pela presença deste ácido. Nossos resultados sugerem que os ácidos graxos acumulados na deficiências da LCHAD e MTP induzem estresse oxidativo e comprometem a homeostase mitocondrial, mecanismos que potencialmente podem estar envolvidos no dano neurológico apresentado pelos pacientes afetados por essas deficiências.

ABSTRACT

Mitochondrial trifunctional protein (MTP) and isolated long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiencies are inborn errors of metabolism of fatty acid oxidation. Affected patients present blood and tissue accumulation of the 3-hydroxy fatty acids, such as 3-hydroxydodecanoic (3HDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids. Clinical presentation is characterized by a encephalopathic crises with coma, lethargy, seizures, mental retardation and hypotonia, besides hepatic dysfunction, cardiomyopathy and muscle weakness and retinopathy. Considering that the pathophysiology of the neurological damage found in LCHAD/MTP-deficient patients is not yet clear, and it has been proposed that accumulating fatty acids could present toxic effects, the aim of the present work was to investigate the *in vitro* effects of 3HDA, 3HTA and 3HPA on oxidative stress parameters and on mitochondrial homeostasis in 30-day-old rat brain. It was first verified that 3HDA, 3HTA and 3HPA significantly induced lipid peroxidation, as determined by increased thiobarbituric acid-reactive substances levels. In addition, carbonyl formation was significantly increased by 3HTA and 3HPA, whereas sulfhydryl content was decreased, which indicates that these fatty acids elicit protein oxidative damage. 3HTA and 3HPA also diminished the reduced glutathione (GSH) levels, the main brain non-enzymatic antioxidant defense, without affecting nitrate and nitrite production. Finally, we observed that 3HTA elicited the most pronounced effects on the tested parameters and the addition of antioxidants and free radical scavengers trolox and deferoxamine (DFO) were able to partially prevent lipid oxidative damage, whereas DFO fully prevented the reduction on GSH levels induced by this fatty acid. We also found that 3HDA, 3HTA and 3HPA markedly increased state 4 respiration and diminished the respiratory control ratio. 3HTA and 3HPA also diminished the mitochondrial membrane potential and the matrix NAD(P)H levels, suggesting an uncoupler effect of oxidative fosforilation . In addition, 3HTA decreased state 3 of respiration and ADP/O ratio, when used glutamate/malate as substrates, but not when piruvate/malate or succinate were used as substrates, suggesting that glutamate transport and/or oxidation could be inhibited by this fatty acid. Taken together, these results suggest that the fatty acids accumulating in LCHAD/MTP induce oxidative stress and impair mitochondrial homeostasis, mechanisms that potentially may be involved on the neurological damage found in affected patientes.

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$ – potencial de membrana mitocondrial

8-OHdGA – 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

ANT – translocador de nucleotídeos de adenina

ATC – atractilosídeo

CCCP – cianeto de carbonila de meta-clorofenil-hidrazona

CoA – coenzima A

CoQ – coenzima Q

CsA – ciclosporina A

DCFH – 2',7'-di-hidroclorofluoresceína

DFO - deferoxamina

EIM – erros inatos do metabolismo

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

GSH – glutationa reduzida

LCHAD – desidrogenase de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia longa

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MCAD – desidrogenase de acil-CoA de cadeia média

MEL – melatonina

MTP – proteína trifuncional mitocondrial

Pi – fosfato inorgânico

RCR – índice de controle respiratório

SCAD – desidrogenase de acil-CoA de cadeia curta

SCHAD – desidrogenase de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia curta

SOD – superóxido dismutase

TAR – reatividade antioxidante total do tecido

TBA-RS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TRAP - potencial antioxidante total do tecido

TRO – trolox

VLCAD – desidrogenase de acil-CoA de cadeia muito longa

I.1. INTRODUÇÃO

I.1.1. Erros Inatos do Metabolismo

Em 1908, Sir Archibald E. Garrod usou pela primeira vez o termo erros inatos do metabolismo (EIM) para designar doenças como a alcaptonúria, em que os indivíduos afetados excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina. Garrod observou uma maior frequência desta doença em indivíduos de uma mesma família e maior incidência de consanguinidade entre os pais dos pacientes. Baseando-se nas leis de Mendel e no fato de que os pais dos indivíduos afetados não apresentavam a doença, Garrod propôs um modelo de herança autossômica recessiva para este distúrbio. Através da observação de que o ácido homogentísico presente em excesso na urina dos pacientes era um metabólito normal da degradação protéica, ele relacionou este acúmulo a um bloqueio na rota de catabolismo da tirosina. Com o surgimento de novos distúrbios relacionados a alterações genéticas e que envolviam o acúmulo de outras substâncias nos líquidos biológicos dos pacientes, postulou-se que estas doenças resultavam da síntese qualitativa ou quantitativamente anormal de uma proteína, enzimática ou não, pertencente ao metabolismo (Scriver, et al. 2001). Presumiu-se, então, que em consequência deste bloqueio metabólico pode ocorrer o acúmulo de precursores da reação catalisada pela enzima envolvida, com o desvio dos precursores para rotas metabólicas alternativas e a deficiência de produtos essenciais ao organismo (Bickel, 1987).

Até o momento foram descritos mais de 500 EIM, a maioria deles envolvendo processos de síntese, degradação, transporte e armazenamento de moléculas no organismo (Scriver et al., 2001). Embora individualmente raras,

essas doenças em seu conjunto afetam aproximadamente 1 a cada 500/2.000 recém nascidos vivos (Baric, Furnic e Hoffmann, 2001).

Neste contexto, o acúmulo tecidual e excreção urinária elevada de ácidos carboxílicos são característicos das acidemias orgânicas e dos defeitos de oxidação de ácidos graxos. Essas doenças são consideradas os distúrbios hereditários do metabolismo mais frequentes em crianças hospitalizadas, o que se refletiu em intensos estudos clínicos, laboratoriais e epidemiológicos nos últimos anos. Os pacientes afetados acumulam em seus tecidos ácidos orgânicos específicos e apresentam severa disfunção neurológica com anormalidades cerebrais relevantes, cuja etiopatogenia é pouco conhecida..

I.1.2. Defeitos de Oxidação de Ácidos Graxos

A β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos é a principal fonte de energia para a síntese de ATP, principalmente em períodos de estresse metabólico e depleção de glicogênio decorrente de um jejum prolongado. Este processo gera acetil-coenzima A e energia na forma de ATP. A rota de oxidação dos ácidos graxos é complexa e inclui muitos passos: captação celular de ácidos graxos, ativação desses mesmos ácidos graxos a ésteres acil-CoA, trans-esterificação a acilcarnitinas, translocação através da membrana mitocondrial, re-esterificação a acil-CoA, e a espiral da beta-oxidação intramitocondrial, que fornece elétrons para flavoproteínas transferidoras de elétrons e acetil-CoA. Cada etapa da espiral de oxidação é catalisada por enzimas específicas para o comprimento da cadeia carbônica do ácido graxo (Smith, Marks e Lieberman, 2005).

Defeitos na β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa podem afetar diversas enzimas catalíticas ou de transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro da mitocôndria. Atualmente, já estão descritas pelo menos 20 diferentes entidades clínicas dentro deste grupo de doenças, incluindo defeitos no transporte de carnitina na membrana plasmática, nas enzimas carnitina palmitoiltransferase I e II (CPT I e CPT II), carnitina/acilcarnitina translocase, nas desidrogenases de acil-CoA de cadeia muito longa (VLCAD), média (MCAD) e curta (SCAD), na 2,4-dienoil-CoA redutase e nas desidrogenases de 3-hidroxi-acil-CoA de cadeia longa (LCHAD) e curta (SCHAD), bem como na proteína trifuncional mitocondrial (MTP) (Roe e Ding, 2001).

Acredita-se que a prevalência dessas doenças seja subestimada, visto que seu diagnóstico depende da detecção dos metabólitos acumulados por métodos sofisticados e equipamentos de alto custo que poucos laboratórios possuem (Walker, 1994; Wajner et al., 2002). Além disso, devido à semelhança do quadro clínico, uma parte considerável dos pacientes afetados por defeitos de oxidação de ácidos graxos é diagnosticada erroneamente como síndrome de morte súbita da infância, infecção bacteriana aguda (septicemia), síndrome de Reye, fígado gorduroso da gravidez ou síndrome de vômito cíclico (Rinaldo et al., 1998).

Dentre os defeitos de β -oxidação de cadeia longa, a deficiência de LCHAD é considerada como clinicamente mais severa e de maior mortalidade que as desordens de oxidação de ácidos graxos de cadeias carbonadas menores, sendo, após a deficiência de MCAD, a doença mais comum desse grupo (Ventura et al., 1998).

I.1.3. Deficiência da proteína trifuncional mitocondrial (MTP) e da Desidrogenase de 3-hidroxiacil-CoA de Cadeia longa (LCHAD)

Ácidos graxos de cadeia longa provenientes da dieta ou mobilizados a partir do tecido adiposo durante a lipólise são convertidos a ésteres de acil-CoA próximos a membrana mitocondrial externa pela enzima acil-CoA tioesterase. Após, são transportados para dentro da matriz mitocondrial através de passos seqüenciais pelas proteínas CPT I, carnitina/acilcarnitina translocase e CPT II. Dentro da mitocôndria cada ciclo de β -oxidação de ácidos graxos de cadeia linear consiste de quatro reações enzimáticas que são específicas para determinado comprimento de cadeia. Para ácidos graxos de cadeia longa, o primeiro passo da β -oxidação é catalisado pela VLCAD. As três reações enzimáticas subseqüentes são catalisadas pela MTP. Esse complexo enzimático se apresenta na forma de um hetero-octâmero ($\alpha_4\beta_4$) associada a membrana mitocondrial interna. A subunidade α contém as enzimas 2-enoil-CoA hidratase e acil-CoA desidrogenase de cadeia longa hidroxilada (LCHAD) enquanto a subunidade β contém a atividade de 3-cetoacil-CoA tiolase (LKAT) (Ushikubo et al. 1996).

Mutações em ambas as subunidades, α e β , podem levar a deficiência da MTP com a redução das três atividades enzimáticas. Contudo, uma mutação isolada no domínio catalítico de uma destas três enzimas resulta em uma deficiência isolada da atividade enzimática. A deficiência da LCHAD aparece como a mais comum dentre as deficiências do complexo MTP. Juntas as deficiências LCHAD/MTP ocorrem com uma prevalência estimada de 1:110.000 nascidos vivos (Das et al. 2006). Recentemente foram identificados dois pacientes

com a deficiência isolada da LKAT (Das et al. 2006; Sander et al. 2005). Assim, desordens do complexo MTP compreendem a deficiência da MTP e as deficiências isoladas da LCHAD e LKAT. A figura 1 mostra a oxidação mitocondrial de ácidos graxos de cadeia longa.

A deficiência da LCHAD (McKusick 143450) é uma desordem de caráter autossômico recessivo que geralmente se manifesta do nascimento até os três anos de idade. Essa desidrogenase catalisa o terceiro passo da oxidação mitocondrial dos ácidos graxos de cadeia longa hidroxilada convertendo 3-hidroxiacil-CoA em seu éster correspondente 3-cetoacil-CoA. Essa desordem metabólica foi primeiramente descrita em 1990 por Wander e colaboradores. Até o presente momento, mais de cem casos foram relatados destacando-se uma sintomatologia clínica variada.

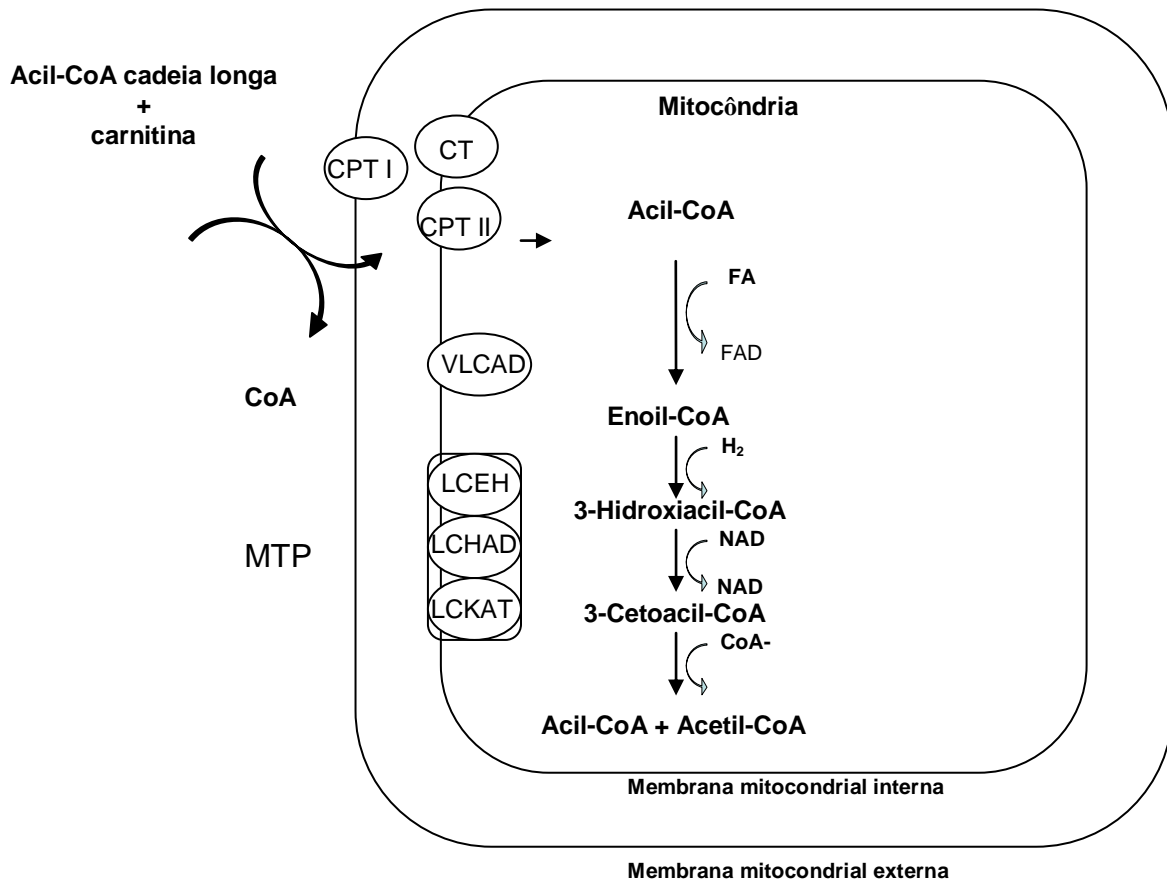


Figura 1. Esquema da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos. Carnitina palmitoiltransferase I e II (CPT I e CPT II), carnitina/acilcarnitina translocase (CT), desidrogenase de acil-CoA de cadeia muito longa (VLCAD), proteína trifuncional mitocondrial (MTP), 2-enoil-CoA hidratase (LCEH), acil-CoA desidrogenase de cadeia longa hidroxilada (LCHAD) and 3-cetoacil-CoA tiolase (LKAT). (Adaptado de Tyni e Pihko, 1999)

A obtenção de energia a partir de ácidos graxos de cadeia longa é prejudicada em todos os defeitos de oxidação de ácidos graxos. Assim, pacientes afetados por essas doenças geralmente apresentam sintomas em situações de estresse metabólico como infecções, vacinação, jejum ou exercício prolongado sobrepondo a capacidade da mitocôndria em oxidar ácidos graxos para a

produção energética. Uma das características apresentadas por esses pacientes é hipoglicemia hipocetótica. A sintomatologia é variada, podendo apresentar vômitos, recusa alimentar, convulsão, letargia, coma, hipotonia, retardo no desenvolvimento motor, retinopatia, neuropatia periférica, além de cardiomiopatia, disfunção hepática, fraqueza muscular ou morte súbita. Alguns pacientes descritos apresentaram quadro epilético com retardo mental e microcefalia (Tyni et al., 1997). Achados neuroradiológicos incluem atrofia cortical. Além disso, possuem infiltração de ácidos graxos em músculo e fibras degeneradas, bem como anormalidades na morfologia mitocondrial e na função dos complexos da cadeia respiratória, indicando disfunção mitocondrial (Tyni et al. 1996).

A apresentação clínica de pacientes afetados pela deficiência da LCHAD é geralmente mais severa que a dos pacientes afetados pela deficiência da MTP, com morte prematura em quatro de cinco casos descritos (Wanders et al., 1999).

O tratamento consiste em evitar períodos de jejum, especialmente durante infecções e períodos de estresse metabólico. Dieta hipercalórica com redução de ácidos graxos de cadeia longa e suplementação com triglicerídeos de cadeia média.

I.1.3.1. Metabólitos Acumulados nos Pacientes com Deficiência da LCHAD e da MTP

O defeito no catabolismo de ácidos graxos de cadeia longa hidroxilada ocasiona um leve aumento das concentrações de ácidos graxos e seus derivados em períodos assintomático. Entretanto, principalmente durante os períodos de

crise, as concentrações desses ácidos graxos encontram-se muito aumentados no sangue e tecidos e são excretados na urina dos pacientes (Costa et al., 1998; Jones et al., 2000).

Testes de laboratório durante episódios sintomáticos revelam hipoglicemia não-cetótica, altos níveis de lactato, leve aumento dos níveis de amônia, aumento plasmático de transaminases e creatina quinase. O perfil de acilcarnitinas do sangue de pacientes afetados apresenta concentrações aumentadas de acilcarnitinas de cadeia longa, 3-hidroxiacilcarnitinas de cadeia longa, ácidos 3-hidroxicarboxílicos e 3-hidroxiácidos de cadeia longa. Também é observada a excreção de grandes quantidades de ácidos dicarboxílicos derivados hidroxilados, como os ácidos 3-hidroxiodecanedióico e 3-hidroxitetradecanedióico. A detecção de ácidos graxos de cadeia longa hidroxilada em sangue e urina permite a diferenciação destas doenças de outros defeitos de β -oxidação mitocondrial. Contudo, a análise do perfil das acil-carnitinas e dos ácidos orgânicos na urina não permite a diferenciação das deficiências da LCHAD e da MTP. A confirmação do diagnóstico pode ser feita por dosagem das enzimas em fibroblastos dos pacientes ou por análise mutacional.

I.1.3.2. Aspectos moleculares das deficiências de LCHAD/MTP

As subunidades α e β da MTP são codificadas por diferentes genes denominados HADHA e HADHB, localizados no cromossomo 2p23. Mais de 60% dos casos associados com a deficiência da LCHAD são homocigóticos para a mutação E474Q (c.1528G>C) no gene HADHA na região catalítica desta enzima.

O restante dos casos consiste da deficiência completa da MTP que é causada por um defeito na subunidade α ou β codificadas pelo gene *HADHB*. Geralmente, as três atividades enzimáticas do complexo MTP são indetectáveis nesta deficiência pela falta das proteínas codificadas por *HADHA* e *HADHB*. Até o presente momento não se tem uma correlação genótipo/fenótipo estabelecida. O fenótipo dessas doenças ainda é geralmente severo com morte prematura em muitos casos. Deve-se considerar também que o desenvolvimento dos sintomas deve ser influenciado pelo grau de estresse metabólico e a combinação de fatores, tais como infecção, hipertermia e jejum (Matsubara et al., 1992).

I.1.3.3. Fisiopatologia nas Deficiências LCHAD/MTP

Há duas hipóteses para explicar a pouca idade em que ocorre o início da apresentação dos sintomas e a alta mortalidade nas deficiências da LCHAD e da MTP: a toxicidade dos ésteres de hidroxilacil-CoA de cadeia longa podem contribuir para o aumento da mortalidade por causar distúrbios no ritmo cardíaco, falência respiratória/ ou hepática. Além disso, o bloqueio na oxidação de ácidos graxos de cadeia longa resulta em uma quase completa incapacidade em sintetizar corpos cetônicos e produzir ATP a partir de ácidos graxos de cadeia longa que é a mais abundante forma de armazenamento de energia no homem.

Neste contexto, há alguns estudos descrevendo efeitos tóxicos *in vitro* de ácidos graxos e seus derivados hidroxilados, a maioria desses estudos está relacionada a um bloqueio em distintos passos do metabolismo energético. Foram demonstrados que hidroxilacilas-CoA de cadeia longa inibiram a síntese de ATP

(Ventura et al. 2005), o translocador de nucleotídeos de adenina, além de transportadores mitocondriais de ácidos dicarboxílicos, bem como enzimas da cadeia respiratória em preparações mitocondriais de fígado de ratos (Ventura et al. 2006). Esses achados reforçam a ideia de que a acidemia láctica descrita em pacientes afetados por essas doenças se deva a um possível distúrbio no sistema fosforilante causado pelo aumento intramitocondrial de acil-CoA de cadeia longa hidroxilada (Ventura et al., 1998; den Boer et al., 2002) .

Outro fator que contribui para a deficiência energética apresentada por estes pacientes é a inibição da gliconeogênese, já que este processo da energia gerada pela lipólise e pela β -oxidação, tanto para o fornecimento de glicerol que pode ser convertido em glicose, quanto para o suprimento energético propriamente dito para que tal processo ocorra. Como uma consequência do defeito da β -oxidação e da depleção energética, um aumento compensatório na produção de glicose seria esperado. Contudo, isto não é observado. Há, no entanto, um aumento da lipólise, aumentando a disponibilidade de ácidos graxos em geral, que potencialmente podem ser metabolizados, sobrepondo a atividade de outras enzimas envolvidas na β -oxidação (Wanders et al. 1999). Assim, o aumento da lipólise compensaria por algumas horas a demanda energética, porém aumentando o risco de efeitos tóxicos mediados por esses ácidos graxos.

Além disso, a síntese diminuída de corpos cetônicos durante o jejum ocorre nas deficiências das proteínas LCHAD e MTP devido a baixa disponibilidade de acetil-CoA, fazendo com que aumente a importância do consumo da glicose sanguínea como fonte de energia celular, ocasionando hipoglicemia nos pacientes. Outra consequência da não-utilização dos ácidos graxos de cadeia

longa hidroxilada na síntese de corpos cetônicos é o acúmulo de acil-CoA de ácido graxo de cadeia longa hidroxilada dentro das mitocôndrias. Eleva-se então a razão acil-CoA:CoA, causando a inibição das enzimas piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, que utilizam coenzima A como substrato. Assim, ocorre diminuição da conversão do piruvato a acetil-CoA e diminuição na velocidade do ciclo do ácido cítrico, visto que a síntese do citrato e a conversão do α -cetoglutarato a succinil-CoA também estão diminuídas.

A hipoglicemia apresentada por pacientes tem sido sugerida com o principal mecanismo de dano cerebral nas deficiências da LCHAD e MTP. Entretanto, considerando que coma e edema cerebral também ocorrem em pacientes afetados por essas doenças que apresentam níveis normais de glicose, sugere que os metabólitos acumulados poderiam estar envolvidos na patogenia do dano neurológico (den Boer et al., 2002).

I.1.4. Fosforilação Oxidativa e Homeostase Mitocondrial

A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual o O_2 é reduzido a H_2O , por elétrons doados pelo NADH e $FADH_2$, que fluem através de vários pares redox (cadeia transportadora de elétrons), gerando ATP a partir de ADP e Fosfato inorgânico (Pi) (Nelson e Cox, 2000). Em eucariotos, a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias, mais especificamente na cadeia respiratória, e é responsável pela maior parte da energia obtida pela célula. As mitocôndrias são corpúsculos envoltos por uma membrana externa, facilmente permeável a pequenas moléculas e íons, e por uma membrana interna, impermeável à maioria

das moléculas e íons, incluindo prótons (Nelson e Cox, 2000). A membrana mitocondrial interna contém transportadores específicos para a passagem de substâncias como o piruvato, glicerolfosfato, malato, ácidos graxos e outras moléculas essenciais às funções mitocondriais (Abeles, Frey e Jencks, 1992). O fluxo de elétrons do NADH e FADH₂ até o O₂ se dá através de complexos enzimáticos ancorados na membrana mitocondrial interna (cadeia transportadora de elétrons). Essa transferência de elétrons é impulsionada por um crescente potencial redox existente entre os equivalentes reduzidos (NADH e o FADH₂), os complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons e o O₂, que é o aceptor final dessa cadeia de reações de oxidação.

A cadeia respiratória é composta por vários complexos enzimáticos e uma coenzima lipossolúvel, a coenzima Q (CoQ) ou ubiquinona (Di Donato, 2000). O complexo I, conhecido como NADH desidrogenase ou NADH: ubiquinona oxidoredutase, transfere os elétrons do NADH para a ubiquinona. O complexo II (succinato desidrogenase) reduz a ubiquinona com elétrons do FADH₂ provenientes da oxidação do succinato a fumarato no ciclo do ácido cítrico. O complexo III, citocromo *bc₁* ou ubiquinona-citocromo *c* oxidoredutase, catalisa a redução do citocromo *c* a partir da ubiquinona reduzida. Na parte final da cadeia de transporte de elétrons, o complexo IV (citocromo *c* oxidase) catalisa a transferência de elétrons de moléculas reduzidas de citocromo *c* para O₂, formando H₂O. São necessárias quatro moléculas de citocromo *c* para reduzir completamente uma molécula de O₂. Todos esses complexos possuem grupamentos prostéticos específicos para desempenharem o papel de aceptores e doadores de elétrons (Abeles, Frey e Jencks, 1992). No entanto, a membrana

mitocondrial interna é impermeável às moléculas de NADH ou a $FADH_2$, necessitando sistemas de transferência desses equivalentes reduzidos do citosol para a matriz mitocondrial. Nesse contexto, a oxidação do NADH formado no citosol é possibilitada por sistemas chamados lançadeiras que transferem elétrons do NADH do citosol para a matriz, através de moléculas capazes de ser transportadas através da membrana mitocondrial interna. Existem duas lançadeiras para este fim, designadas de lançadeira do glicerol-3-fosfato e lançadeira de malato/aspartato, conforme ilustra a figura 2. Uma vez formadas na matriz, as moléculas de NADH e $FADH_2$ podem ceder elétrons para o complexo I ou para a CoQ, respectivamente, suprindo a cadeia respiratória (Nelson e Cox, 2000).

O fluxo de elétrons através dos complexos da cadeia respiratória é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, através dos complexos I, III e IV, gerando um potencial de membrana. Assim, cria-se um gradiente eletroquímico transmembrana que pode ser utilizado por um quinto complexo protéico, a ATP sintase, para a síntese de ATP. Dessa forma, a oxidação de substratos energéticos está acoplada ao processo de fosforilação do ADP, ou seja, quando o potencial de membrana é dissipado pelo fluxo de prótons a favor do gradiente eletroquímico, a energia liberada é utilizada pela ATP sintase, que atua como uma bomba de prótons ATP-dependente (Nelson e Cox, 2000).

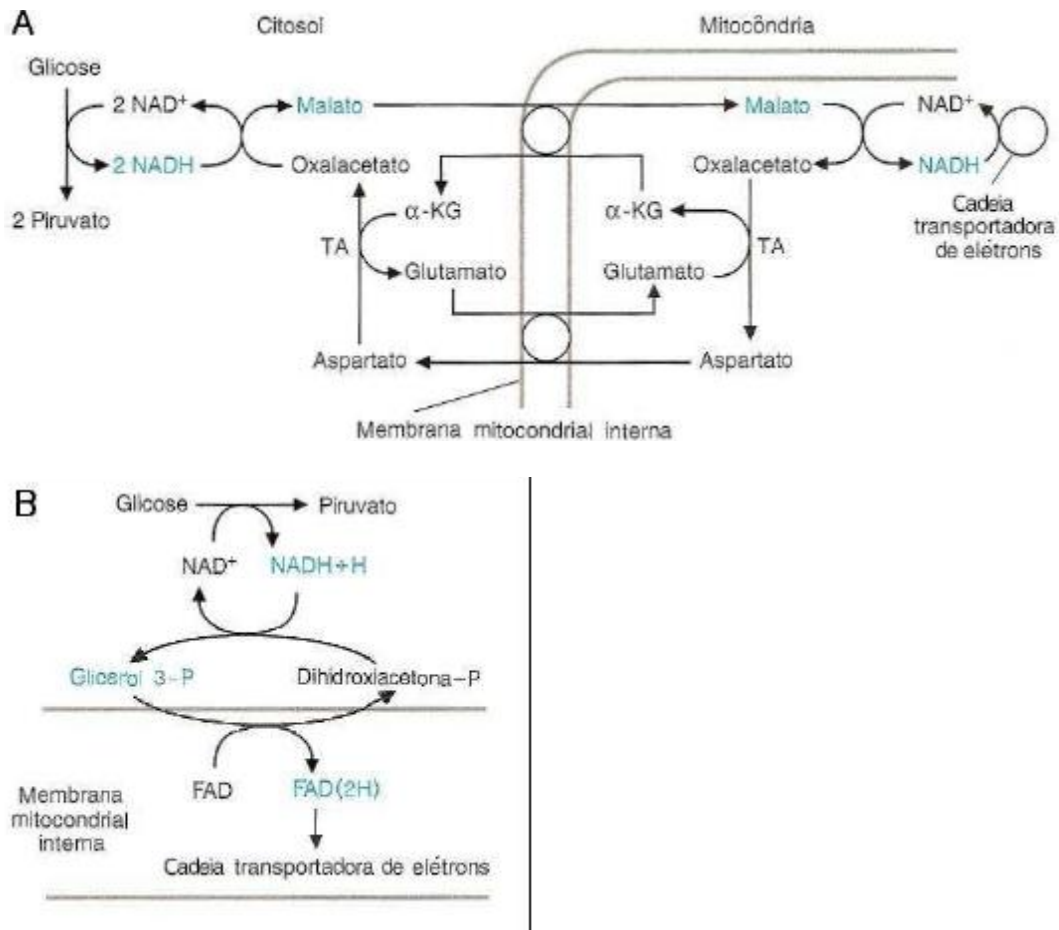


Figura 2. Lançadeira do malato (A) e lançadeira do glicerol-3-P (B) (Adaptado de Smith, Marks e Lieberman, 2005).

Desse modo, a respiração mitocondrial pode ser estimada através da medida do consumo de O₂. Apesar de que essa medida determina diretamente apenas a velocidade de uma única reação (transferência final de elétrons para O₂), muitas informações sobre outros processos mitocondriais podem ser obtidos simplesmente pela adaptação das condições de incubação, tornando o processo de análise significativo na taxa de consumo final de oxigênio. Vários passos podem ser investigados, incluindo o transporte de substratos através da membrana mitocondrial, a atividade das desidrogenases, a atividade dos complexos da cadeia respiratória, o transporte de nucleotídeos de adenina pela

membrana mitocondrial, a atividade da ATP sintase e a permeabilidade da membrana mitocondrial a H^+ (Nicholls e Ferguson, 2002). Experimentalmente, pode-se dividir a respiração mitocondrial em 5 estágios, conforme ilustra a figura 3. No entanto, apenas os parâmetros estados 3 e 4 são comumente utilizados. O estado 3 representa o consumo de oxigênio quando as mitocôndrias, em um meio contendo substrato oxidável, são expostas a ADP, estimulando o consumo de O_2 e produzindo ATP (estado fosforilante). O estado 4 reflete o consumo de O_2 após as mitocôndrias já terem depletado todo o ADP disponível, reduzindo a taxa da respiração (estado não-fosforilante) (Nicholls e Ferguson, 2002). A transdução de energia entre a cadeia respiratória e o gradiente eletroquímico de H^+ é bem regulada, sendo que um pequeno desequilíbrio termodinâmico entre ambos pode resultar em uma alteração importante no transporte de elétrons pela mesma. Assim, quando o gradiente de prótons é dissipado pela ação da ATP sintase, devido à adição de ADP, há um desequilíbrio que estimula a transferência de elétrons pela cadeia respiratória e, conseqüentemente, o consumo de oxigênio. Sendo assim, para que a ATP sintase esteja ativa, são necessários dois fatores: disponibilidade de ADP e potencial de membrana suficientemente alto (Nelson e Cox, 2000). Nesse contexto, o acoplamento da respiração mitocondrial é definido como a capacidade da mitocôndria gerar energia (ATP) quando exposta ao ADP, ou seja, unir (acoplar) os processos de oxidação e de fosforilação. A dissipação do gradiente eletroquímico de prótons no espaço mitocondrial intermembranas determinado por dano ou aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna desacopla o transporte de elétrons da síntese de ATP, resultando em um

aumento do consumo de oxigênio (atividade respiratória aumentada) com reduzida formação de ATP (Nicholls e Ferguson, 2002).

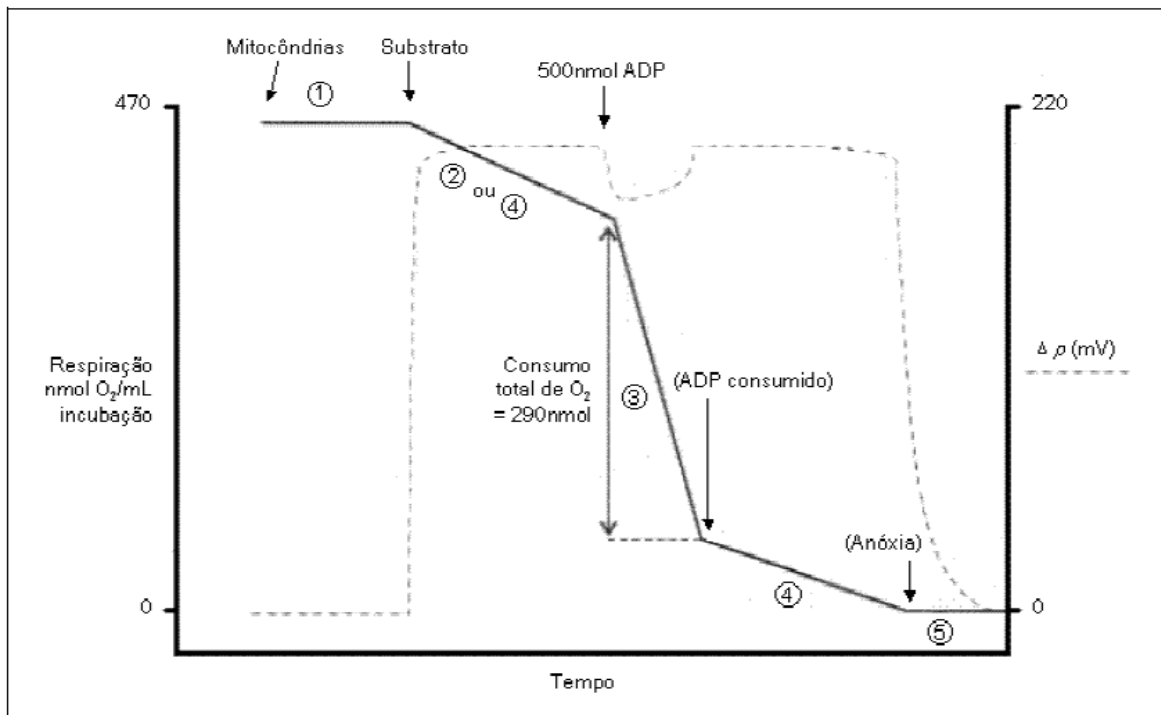


Figura 3. Estados da respiração mitocondrial. (Adaptado de Nicholls e Ferguson, 2002).

Além da regeneração do ATP, que é a sua principal função, a mitocôndria desempenha outros importantes papéis. Esta organela é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio e de defesas antioxidantes nas células (Cadenas e Davies, 2000), gerando ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$) no espaço intermembrana pelo vazamento de elétrons que se combinam com o oxigênio molecular no complexo III em um processo que é dependente do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), e na matriz, através de um sítio não definido do complexo I (Han et al., 2001). Além disso, a mitocôndria participa ativamente da homeostase de cálcio (Nicholls e Akerman, 1982) e está envolvida em diversos processos que levam à morte

celular, incluindo liberação de citocromo c (Liu et al., 1996). Acredita-se que todos estes processos estejam interligados e que um desequilíbrio nessas funções possa estar envolvido na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerose lateral amiotrófica (Beal, 2007; Sasaki et al., 2007; Gil e Rego, 2008; Reddy e Beal, 2008), doenças psiquiátricas, tais como transtorno bipolar, esquizofrenia e depressão (Wang, 2007; Ben-Shacar e Kerry, 2008; Gardner et al., 2008; Shao et al., 2008; Regenold et al., 2009), bem como também de vários erros inatos do metabolismo (Schuck et al., 2002; Reis de Assis et al., 2004; Latini et al., 2005; Zugno et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Mirandola et al., 2008; Moshal et al., 2008; Ribeiro et al., 2008; Viegas et al., 2008).

A função mitocondrial pode ser avaliada pela medida da produção de espécies reativas, do potencial de membrana mitocondrial, do estado redox estimado pelo conteúdo de NAD(P)H/NAD(P)⁺, e pelo inchamento mitocondrial, que pode ser secundário à abertura do poro de transição mitocondrial.

1.1.5. Radicais Livres

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (Southorn e Powis, 1988; Halliwell, 2001; Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular (O₂) sofre redução tetravalente, com incorporação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H₂O). No entanto, aproximadamente 5% do

oxigênio utilizado na cadeia respiratória mitocondrial não são completamente reduzido à água, podendo ser convertido a intermediários reativos como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxil ($^{\bullet}OH$), e também a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), processo esse que pode ser exacerbado em condições patológicas (Boveris, 1998).

O termo genérico “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) é usado para incluir não só os radicais formados pela redução do O_2 , o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), mas também alguns não-radicais derivados do oxigênio, como o H_2O_2 , o oxigênio singlet (1O_2) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Além dessas, existem ainda as espécies reativas de nitrogênio (ERN), sendo o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) os principais representantes.

As ERO e ERN ocorrem tanto em processos fisiológicos quanto patológicos do organismo. Fisiologicamente, essas espécies reativas apresentam diversas funções (Bergendi et al., 1999). Assim, um aumento da liberação local de radicais livres pode ser benéfico, como é o caso da liberação de espécies tóxicas oxidantes pelos neutrófilos, que podem atuar na defesa do hospedeiro contra uma infecção (Delanty e Dichter, 1998; Halliwell e Gutteridge, 2007). Participam ainda de processos de sinalização celular e também estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Por outro lado, quando formadas em excesso, essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas (Maxwell, 1995). Com relação aos efeitos prejudiciais das reações oxidantes ao organismo, os radicais livres podem promover lipoperoxidação, causar a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade

(LDL), reagir com proteínas, levando à sua inativação e consequente alteração de sua função e reagir com o DNA e RNA, levando a mutações somáticas e à distúrbios de transcrição (Delanty e Dichter, 1998; Halliwell e Whiteman, 2004), dentre outros efeitos.

I.1.5.1. Defesas Antioxidantes

Para evitar os efeitos danosos das espécies reativas, existem mecanismos eficientes para sua eliminação, como a produção endógena de enzimas antioxidantes e alguns antioxidantes não-enzimáticos. Embora diferindo na composição, as defesas antioxidantes estão amplamente distribuídas no organismo (Halliwell e Gutteridge, 2007) e compreendem:

- agentes que removem cataliticamente os radicais livres, como as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, entre outras;
- proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes (íons de ferro e cobre, por exemplo), ao se ligarem aos mesmos como as transferrinas;
- proteínas que protegem biomoléculas de dano oxidativo por outros mecanismos;
- agentes de baixo peso molecular que aprisionam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como glutathione, α -tocoferol, ácido ascórbico e a bilirrubina.

I.1.5.2. Estresse Oxidativo

Organismos saudáveis em condições normais produzem espécies reativas, que em sua maior parte são controladas pelos sistemas de defesa antioxidante. No entanto, em determinadas condições patológicas pode haver um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes, favorecendo a ocorrência do estresse oxidativo.

Assim, o termo “estresse oxidativo” é usado para se referir à situação na qual a geração de espécies reativas ultrapassa a capacidade das defesas antioxidantes disponíveis. Pode resultar tanto de uma diminuição das defesas antioxidantes quanto de uma produção aumentada de oxidantes, bem como da liberação de metais de transição ou a combinação de quaisquer desses fatores (Halliwell, 2006).

O estresse oxidativo pode promover adaptação, dano ou morte celular:

- Adaptação: as células podem tolerar um estresse oxidativo moderado, que geralmente resulta em um aumento da síntese de sistemas de defesa antioxidante a fim de restaurar o balanço oxidante/antioxidante. Apesar disso, nem sempre o estresse oxidativo precisa envolver defesas antioxidantes aumentadas.
- Dano celular: o estresse oxidativo pode danificar alvos moleculares (DNA, proteínas, carboidratos e lipídios) (Halliwell e Gutteridge, 2007). A resposta à injúria pode ser reversível: a célula entra em um estado de homeostase alterado temporário ou prolongado, que não leva à morte celular.

- Morte celular: pode ocorrer tanto por necrose quanto por apoptose.

Na morte celular por necrose, a célula incha e se rompe, liberando seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a liberação de antioxidantes, como a catalase e a glutatona reduzida, e também de pró-oxidantes, como os íons cobre e ferro e proteínas do grupo heme, agentes esses que podem afetar as células adjacentes, podendo até mesmo induzi-las a um estresse oxidativo. Já na apoptose, o mecanismo de morte celular programada é ativado e não há a liberação do conteúdo celular. A apoptose pode estar acelerada em certas doenças, tais como as desordens neurodegenerativas, havendo envolvimento do estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

I.1.5.3. Estresse Oxidativo e Doenças Neurodegenerativas

Numerosas hipóteses têm sido propostas para explicar a neurodegeneração das doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (Alexi et al., 2000; Mendéz-Álvarez et al., 2001; Behl et al., 2002; Halliwell, 2006), sem, entretanto, obter até o momento uma explicação completamente satisfatória para explicar o dano cerebral dessas doenças. No entanto, acredita-se que possíveis mecanismos envolvam deficiência no metabolismo energético, estresse oxidativo e neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (excitotoxicidade), ou, possivelmente, um somatório desses fatores (Rose e Henneberry, 1994).

Numerosas evidências sugerem que os radicais livres e o estresse oxidativo possam estar envolvidos na patogênese do dano neurológico em várias doenças

neurodegenerativas. Estudos demonstraram uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia respiratória em cérebros *postmortem* de pacientes portadores de doença de Parkinson (Schapira et al., 1990). Essa inibição do complexo I pode acarretar um aumento na geração de espécies reativas, tais como ânion superóxido, hidroxil e peroxinitrito, as quais poderiam causar um prejuízo ainda maior na cadeia transportadora de elétrons. Dessa forma, é possível que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial formem um “ciclo vicioso” na doença de Parkinson (Schapira et al., 1989, 1990a,b;Gu et al., 1998).

Na doença de Alzheimer, a mais comum dentre as doenças neurodegenerativas, é possível que o estresse oxidativo tenha um papel chave na morte neuronal. Tem sido proposto que o peptídeo β -amilóide, o formador das chamadas placas senis, tenha a capacidade de gerar radicais livres espontaneamente. Estudos também evidenciaram um dano oxidativo em cérebros humanos *postmortem* com doença de Alzheimer, através da observação de aumento de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdGA), produtos de oxidação de outras bases e de RNA, carbonilas de proteínas, nitrotirosina e marcadores de peroxidação lipídica (Markesbery e Carney, 1999; Nourooz-Zadeh et al., 1999; Lovell et al., 2000).

Por outro lado, vários estudos têm evidenciado um dano oxidativo importante em pacientes portadores da doença de Huntington, particularmente representado pela formação de 3-nitrotirosina nas áreas afetadas (Alexi et al., 2000). Entretanto, o dano oxidativo observado nessa doença aparentemente tem menor importância do que nas doenças de Parkinson e Alzheimer.

Nos últimos anos, foi verificado que vários metabólitos acumulados em alguns EIM induzem estresse oxidativo no cérebro de animais experimentais (Latini et al., 2007; Feksa et al., 2008; Kessler et al., 2008; Leipnitz et al., 2008; Zugno et al., 2008) e em seres humanos (Sitta et al., 2006; Deon et al., 2007; Ribeiro et al., 2007; Barschak et al., 2008a,b; Deon et al., 2008), indicando que compostos acumulados nestas doenças possam causar dano oxidativo.

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o efeito *in vitro* de metabólitos acumulados nas deficiências da LCHAD e MTP sobre importantes parâmetros de estresse oxidativo e de função mitocondrial em cérebro de ratos jovens, visando a uma melhor compreensão dos mecanismos neurotóxicos desses ácidos graxos.

I.2.2. Objetivos Específicos

- Investigar o efeito *in vitro* dos ácidos 3-hidroxdodecanóico (3HDA), 3-hdroxitetradecanóico (3HTA) e 3-hidroxpalmítico (3HPA) nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 μM sobre o dano oxidativo lipídico (níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), dano oxidativo protéico (formação de carbonilas e o conteúdo de grupamentos tióis), defesas antioxidantes não-enzimáticas (concentração de glutathiona reduzida) e sobre a produção de nitratos e nitritos em homogeneizado de córtex cerebral de ratos de 30 dias de vida.

- Investigar o efeito *in vitro* dos ácidos 3-hidroxdodecanóico (3HDA), 3-hdroxitetradecanóico (3HTA) e 3-hidroxpalmítico (3HPA) nas concentrações de 25, 50 e 100 μM sobre os parâmetros respiratórios estados 3 e 4, índice de controle respiratório (RCR) e a razão ADP/O, medidos através do consumo de oxigênio em preparações mitocondriais de cérebro de ratos;

- Investigar o efeito *in vitro* dos ácidos 3-hidroxiodecanóico (3HDA), 3-hidroxitetradecanóico (3HTA) e 3-hidroxi palmítico (3HPA) nas concentrações de 25, 50 e 100 μM sobre o potencial de membrana mitocondrial e sobre o conteúdo dos equivalentes reduzidos de NADH e NADPH em preparações mitocondriais de cérebro de ratos;

PARTE II

Artigos Científicos

Capítulo I

Long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in LCHAD and MTP deficiencies induce oxidative damage and reduce the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats

Anelise M. Tonin, Mateus Grings, Estela N. B. Busanello, Alana P. Moura, Gustavo da Costa Ferreira, Carolina Maso Viegas, Carolina G. Fernandes, Patrícia F. Schuck, Moacir Wajner

Artigo científico submetido para publicação no periódico

Cellular and Molecular Neurobiology

Long-chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in LCHAD and MTP deficiencies induce oxidative damage and reduce antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats

Anelise M. Tonin¹, Mateus Grings¹, Estela N. B. Busanello¹, Alana P. Moura¹,
Gustavo C. Ferreira¹, Carolina M. Viegas¹, Carolina G. Fernandes¹, Patrícia F.
Schuck^{1,3}, Moacir Wajner^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

³Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do
Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.

Correspondence: M. Wajner, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: 55 51 33085571. Fax: 55 51 33085540, E-mail. mwajner@ufrgs.br

Abstract

Accumulation of long chain 3-hydroxy fatty acids is the biochemical hallmark of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) and mitochondrial trifunctional protein (MTP) deficiencies. These disorders are clinically characterized by neurological symptoms, such as convulsions and lethargy, as well as by cardiomyopathy and muscle weakness. In the present work we investigated the *in vitro* effect of 3-hydroxydodecanoic (3HDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids, which accumulate in these disorders, on important oxidative stress parameters in cerebral cortex of young rats in the hope to clarify the mechanisms leading to the brain damage found in patients affected by these disorders. It was first verified that these compounds significantly induced lipid peroxidation, as determined by increased thiobarbituric acid-reactive substances levels. In addition, carbonyl formation was significantly increased and sulfhydryl content decreased by 3HTA and 3HPA, which indicates that these fatty acids elicit protein oxidative damage. 3HTA and 3HPA also diminished the reduced glutathione (GSH) levels, without affecting nitrate and nitrite production. Finally, we observed that the addition of the antioxidants and free radical scavengers trolox and deferoxamine (DFO) were able to partially prevent lipid oxidative damage, whereas DFO fully prevented the reduction on GSH levels induced by 3HTA. Our present data showing that 3HDA, 3HTA and 3HPA elicit oxidative stress in rat brain indicate that oxidative damage may represent an important pathomechanism involved in the neurologic symptoms manifested by patients affected by LCHAD and MTP deficiencies.

Running Title: Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and oxidative stress

Mitochondrial β -oxidation of fatty acids is an important source of energy, especially during fasting episodes and during metabolic stress. The last three steps of β -oxidation of long-chain fatty acids are catalyzed by a multienzyme complex associated with the inner mitochondrial membrane, the trifunctional protein (MTP). This complex encompasses the activities of long-chain enoyl-CoA hydratase, long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) and long-chain 3-ketothiolase. There are clinical and molecular genetics differences between isolated LCHAD deficiency and the combined defects of all three catalytic activities (MTP deficiency). Plasma accumulation and high excretion of long-chain 3-hydroxyacylcarnitines and fatty acids including 3-hydroxydodecanoic (3HDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids in urine are the biochemical hallmarks of these disorders (Costa et al. 1998).

Isolated LCHAD deficiency (McKusick 600890) is recognized with increasing frequency, and is one of the most severe fatty acid oxidation disorders. The phenotypic spectra in LCHAD deficient patients include liver failure, psychomotor delay, seizures, microcephaly, cardiomyopathy, skeletal myopathy, retinal pigmentary changes, peripheral neuropathy, lethargy, coma and sudden death. The cerebral MRI imaging reveals brain cortical atrophy with white matter hypodensity (Tyni et al., 1996; den Boer et., 2002). Otherwise, MTP deficient patients present primarily with heart disease and/or skeletal myopathy (Jackson et al. 1992) and only a few patients with this disorder had a predominant liver disease. Progressive encephalopathy is also found in both disorders (Tyni and Pihko 1999) and the appearance of the clinical symptoms usually occurs between birth and 3 years of age and is usually triggered by fasting or infections (Tyni and

Pihko 1999). These stress situations are characterized by a dramatic increase of the concentrations of the accumulating fatty acids, so it is conceivable that neurotoxic actions may be attributed to these compounds, as previously postulated (Roe and Coates, 1989; Gregersen et al., 2001; Spiekerkoetter et al. 2004).

At present, the pathomechanisms of the tissue damage of disorders in which long chain 3-hydroxy fatty acids accumulate are virtually unknown. Considering that oxidative stress was shown to be involved in the pathophysiology of common neurodegenerative disorders (Perez-Severiano et al. 2000; Bogdanov et al. 2001; Behl and Moosmann 2002; Stoy et al. 2005; Berg and Youdim 2006; Mancuso et al. 2006) and that the role of 3HDA, 3HTA and 3HPA on biological oxidations has not yet been evaluated, the aim of the present work was to investigate the *in vitro* effects of 3HDA, 3HTA and 3HPA on a wide spectrum of oxidative stress parameters in homogenates from cerebral cortex of young rats. The evaluated parameters were thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS), carbonyl content, sulfhydryl groups oxidation, reduced glutathione (GSH) levels and nitrates and nitrites production.

1. Experimental procedures

1.1 Animals and reagents

Thirty-day-old male Wistar rats obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry, ICBS, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS – Brazil, were used. The animals were maintained on a 12:12 h light / dark cycle (lights on 07.00 - 19.00 h) in air conditioned constant temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) colony room, with free access to water and 20% (w/w) protein

commercial chow (SUPRA, Porto Alegre, RS, Brazil). The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for animal research of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil and followed the “Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication 85-23, revised 1996). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except for 3HDA and 3HTA that were purchased from Indofine Chemical Company, Hillsborough, New Jersey, United States of America. 3HDA, 3HTA and 3HPA were dissolved on the day of the experiments in the incubation medium used for each technique with pH adjusted to 7.4. The final concentrations of these fatty acids in the medium ranged from 10 μ M to 100 μ M.

1.2 Tissue preparation and incubation

On the day of the experiments the animals were sacrificed by decapitation without anesthesia, and the brain was rapidly excised on a Petri dish placed on ice. The olfactory bulbs, pons, medulla, cerebellum and striatum were discarded, and the cerebral cortex was peeled away from the subcortical structures, weighed and homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. Homogenates were centrifuged at 750 x *g* for 10 min at 4°C to discard nuclei and cell debris (Evelson et al. 2001). The pellet was discarded and the supernatant, a suspension of mixed and preserved organelles, including mitochondria, was separated and incubated in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl at 37° C for one hour with 3HDA, 3HTA or 3HPA at final concentrations of 10, 25, 50 and 100 μ M. Controls did not contain any

of these metabolites in the incubation medium. Immediately after incubation, aliquots of the cortical supernatants were incubated in the absence or presence of the metabolites (1:5, v/v) for 60 min, after which the values of TBA-RS levels, carbonyl and sulfhydryl content, GSH concentrations and nitrates and nitrites levels were measured.

We always carried out parallel experiments with blanks (controls) in the presence or absence of the tested metabolites (3HDA, 3HTA and 3HPA) and without cortical supernatants in order to detect artifacts caused by these fatty acids in the assays. By doing so, any interference of these acids on the reactions used to measure the oxidative stress parameters would be identified.

1.3 Thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) levels

TBA-RS levels were determined according to the method of Esterbauer and Cheeseman (1990). Briefly, 300 μ L of cold 10 % trichloroacetic acid were added to 150 μ L of 3HDA, 3HTA or 3HPA pre-treated cerebral cortex supernatants and centrifuged at 300 x *g* for 10 min. Three hundred microliters of the supernatant were transferred to a pyrex tube and incubated with 300 μ L of 0.67 % TBA in 7.1 % sodium sulphate on a boiling water bath for 25 min. The tubes containing the mixture were allowed to cool on running tap water for 5 min. The resulting pink-stained TBA-RS was determined in a spectrophotometer at 532 nm. A calibration curve was performed using 1,1,3,3-tetramethoxypropane, and each curve point was subjected to the same treatment as supernatants. Some experiments were performed in the presence or absence of melatonin (MEL; 100 μ M), trolox (TRO; 5

μM), the nitric oxide synthase inhibitor N^ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 200 μM), a combination of the antioxidant enzymes catalase (CAT; 10 mU/mL) plus superoxide dismutase (SOD; 10 mU/mL), deferoxamine (DFO; 150 μM) or reduced glutathione (GSH; 100 μM). The concentrations of the antioxidant used were as previously described (Leipnitz et al. 2009). TBA-RS values were calculated as nmol of TBA-RS/mg protein and represented as percentage of control.

1.4 Determination of protein carbonyl formation content

Protein carbonyl content formation, a marker of oxidized proteins, was measured spectrophotometrically according to Reznick and Packer (1994). One hundred microliters of the aliquots from the incubation were treated with 400 μL of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) dissolved in 2.5 N HCl or with 2.5 N HCl (blank control) and left in the dark for one hour. Samples were then precipitated with 500 μL 20 % TCA and centrifuged for 5 min at 10,000 x g. The pellet was then washed with 1 mL ethanol: ethyl acetate (1:1, v/v) and re-dissolved in 550 μL 6 M guanidine prepared in 2.5 N HCl. Then, the tubes were incubated at 37 ° C for 5 min to assure the complete dissolution of the pellet and the resulting sample was determined at 365 nm. The difference between the DNPH-treated and HCl-treated samples was used to calculate the carbonyl content. The results were calculated as nmol of carbonyls groups/mg of protein and represented as percentage of control, using the extinction coefficient of 22,000 x 10⁶ nmol/mL for aliphatic hydrazones.

1.5 Sulfhydryl (thiol) group oxidation

This assay is based on the reduction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm (Aksenov and Markesbery, 2001). Briefly, 0.1 mM DTNB was added to 3HDA, 3HTA or 3HPA pre-treated cortical supernatants. This was followed by 30 min incubation at room temperature in a dark room. Absorption was measured at 412 nm. The protein-bound sulfhydryl content is inversely correlated to oxidative damage to proteins. Results were reported as nmol TNB/mg protein and represented as percentage of control.

1.6 Reduced glutathione (GSH) concentrations

Reduced glutathione (GSH) concentrations were measured according to Browne and Armstrong (1998). 3HDA, 3HTA or 3HPA pre-treated cerebral cortex supernatants were diluted in 20 volumes of (1:20, v/v) 100 mM sodium phosphate buffer pH 8.0, containing 5 mM EDTA. One hundred microliters of this preparation were incubated with an equal volume of *o*-phthaldialdehyde (1 mg/mL methanol) at room temperature during 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 nm and 420 nm, respectively. Some experiments were performed in the presence or absence of melatonin (MEL; 100 μ M), trolox (TRO; 5 μ M), the nitric oxide synthase inhibitor N ^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 200 μ M), a combination of the antioxidant enzymes catalase (CAT; 10 mU/mL) plus superoxide dismutase (SOD; 10 mU/mL) or deferoxamine (DFO; 150 μ M). Calibration curve was prepared with standard GSH (0.01 - 1 mM) and the

concentrations were calculated as nmol/mg protein and represented as percentage of control.

The oxidation of a commercial solution of GSH (200 μ M) was also tested by exposing this solution to 100 μ M of 3HTA or 3HPA for one our in a medium devoid of brain supernatants. After 3HTA or 3HPA exposition, 7.4 mM *o*-phthaldialdehyde was added to the vials and the mixture was incubated at room temperature during 15 min.

1.7 Nitrate and nitrite determination

Nitrate and nitrite concentrations were determined according to Miranda *et al.*, (2001). Briefly, 12 μ L of 20 % trichloroacetic acid were added to 300 μ L of 3HDA, 3HTA or 3HPA pre-treated cerebral cortex supernatants and centrifuged at 12,000 x *g* for 10 min. Two hundred microliters of the supernatant were transferred to a eppendorf tube and incubated with 200 μ L of 0.8 % VCl_3 in 1 M HCl and 200 μ L of the Griess reagent (2% sulfanilamide in 5% HCl and 0.1% *N*-1-(naphthyl)ethylenediamine in H_2O) at 37°C for 30 min in a dark room. Absorbance was then determined at 540 nm by spectrophotometry. A calibration curve was performed using sodium nitrate, and each curve point was subjected to the same treatment as supernatants and the concentrations were calculated as μ mol/mg protein and represented as percentage of control.

1.8 Protein determination

Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard.

1.9 Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard error of the mean. Assays were performed in triplicate and median was used for statistical analysis. Data was analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post-hoc Duncan multiple range test when F was significant. Linear regression analysis was used to detect dose-dependent effects. Differences between groups were rated significant at $P < 0.05$. All analyses were carried out in an IBM-compatible PC computer using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software.

2. Results

2.1 Lipid peroxidation is induced by 3HDA, 3HTA and 3HPA in rat cerebral cortex

We initially tested the influence of 3HDA, 3HTA and 3HPA on TBA-RS levels. Figure 1 shows that 3HDA (A), 3HTA (B) and 3HPA (C) significantly increased TBA-RS levels relative to controls [3HDA: $F_{(5,24)} = 2.91$; $P < 0.05$; 3HTA: $F_{(4,20)} = 12.59$; $P < 0.001$; 3HPA: $F_{(4,25)} = 10.25$; $P < 0.001$] in a dose-dependent manner [3HDA: $\beta = 0.607$; $P < 0.001$; 3HTA: $\beta = 0.796$; $P < 0.001$; 3HPA: $\beta = 0.747$; $P < 0.001$].

We also tested the effect of the antioxidants melatonin (MEL; 100 μ M), trolox (TRO; 5 μ M), the nitric oxide synthase inhibitor N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 200 μ M), the combination of the antioxidant enzymes catalase

(CAT; 10 mU/ mL) plus superoxide dismutase (SOD; 10 mU/mL), deferoxamine (DFO; 150 μ M) or glutathione (GSH; 100 μ M) on the 3HTA-elicited increase of TBA-RS levels. These antioxidants were co-incubated with 100 μ M 3HTA and cerebral cortex homogenates for 60 min, after which the TBA-RS levels were measured. We observed that TRO and DFO partially prevented 3HTA-induced increased lipid peroxidation [$F_{(7,40)}=10,57$; $P < 0.001$] (Figure 1D). In contrast, MEL, L-NAME, CAT plus SOD and GSH, were not able to prevent the increase of TBA-RS values caused by 3HTA relative to controls.

3HTA and 3HPA induce protein oxidative damage in rat cerebral cortex

2.2 3HTA and 3HPA induce protein oxidative damage in rat cerebral cortex

We then evaluated the effect of 3HDA, 3HTA and 3HPA on carbonyl formation and sulfhydryl oxidation in cortical homogenates in order to evaluate protein oxidation parameters. We found that 3HTA [$F_{(4,20)}=31,80$; $P < 0.001$] and 3HPA [$F_{(4,15)}=3,085$; $P < 0.05$] significantly increased protein carbonyl groups content in cortical homogenates relative to controls (Figure 2), in a dose-dependent manner [3HTA: $\beta = 0.918$; $P < 0.001$; 3HPA: $\beta = 0.666$; $P < 0.001$]. 3HTA [$F_{(4,20)}=6.65$; $P < 0.001$] and 3HPA [$F_{(4,25)}= 4.11$; $P < 0.01$] also decreased sulfhydryl content relative to controls in a dose-dependent manner [3HTA: $\beta = -0.717$; $P < 0.001$] (Figure 3). In contrast, 3HDA did not affect any of these parameters relative to controls.

2.3 Non-enzymatic antioxidant defenses are decreased by 3HTA and 3HPA in rat cerebral cortex

The *in vitro* effect of 3HDA, 3HTA and 3HPA on the non-enzymatic antioxidant defense was then investigated by measuring GSH levels. We found that 3HTA [$F_{(4,25)}=4.61$; $P < 0.01$] and 3HPA [$F_{(4,25)}=20.59$; $P < 0.001$], but not 3HDA, significantly decreased GSH levels relative to controls (Figure 4 A,B,C). Furthermore, when DFO was co-incubated with 100 μ M 3HTA, the decrease in GSH levels was totally prevented [$F_{(6,35)}=6.12$; $P < 0.001$] (Figure 4D). However, the other antioxidants including MEL, TRO, L-NAME and CAT plus SOD were not able to prevent this effect.

2.4 3HTA and 3HPA do not directly react with a commercial solution of GSH

We then investigated whether the 3HTA and 3HPA-induced GSH levels decrease was due to a direct oxidative attack or to an artifact. We therefore exposed a commercial solution of GSH (200 μ M) to 100 μ M of 3HTA or 3HPA for 60 min in the absence of tissue supernatants. It was observed that these compounds did not oxidize free GSH, suggesting that these long chain fatty acid *per se* are not direct oxidant agents, but elicit oxidative damage probably via free radical generation. (Table I)

2.5 3HDA, 3HTA and 3HPA do not affect nitrite and nitrate generation in rat cerebral cortex

Finally, the effect of 3HDA, 3HTA and 3HPA on reactive nitrogen species generation was assessed, by measuring nitrate and nitrite production. We observed that this parameter was not altered by 3HDA, 3HTA and 3HPA (data not shown).

3. Discussion

Long chain 3-hydroxy fatty acids accumulate in plasma and are extensively excreted in urine of patients affected by long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) and mitochondrial trifunctional protein (MTP) deficiencies, a group of diseases affecting fatty acid oxidation (Tyni et al. 1996; Jones et al. 2000). These disorders are characterized by hypoketotic hypoglycemia, seizures and lethargy, as well as retinopathy, peripheral neuropathy and multiple organ failure (Tyni et al. 1996) and current long-term therapy includes avoidance of fasting and a high carbohydrate low-fat diet with supplementary dietary medium-chain fatty acids (Roe and Ding 2001; Jones et al. 2003). To date, very little is known about the mechanisms underlying the neuropathology of LCHAD and MTP deficiencies. Hypoglycemia may acutely affect the central nervous system. However, it has been recently proposed that the metabolites accumulating in fatty acid oxidation disorders including LCHAD and MTP deficiencies, may be neurotoxic, since encephalopathic crises that sometimes lead to a fatal outcome occur in the absence of low blood glucose levels. (Roe and Coates 1989; Gregersen et al. 2001; Spiekerkoetter et al. 2004).

There are convincing evidences that oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) generation are related to the etiology and/or progression of a

number of neurodegenerative disorders (Perez-Severiano et al. 2000; Bogdanov et al. 2001; Behl and Moosmann 2002; Stoy et al. 2005; Berg and Youdim 2006; Mancuso et al. 2006) and also of some inherited disorders of the intermediary metabolism (de Oliveira Marques et al. 2003; Barschak et al. 2006; Sgaravatti et al. 2007; Schuck et al. 2007, 2009). Considering that the role of long-chain 3-hydroxy fatty acids on biological oxidations was not yet fully evaluated, in the present work we investigated the *in vitro* influence of 3-hydroxydodecanoic (3HDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on a large number of oxidative stress parameters in cerebral cortex of young rats.

3HDA, 3HTA and 3HPA at micromolar doses significantly increased lipid peroxidation in cerebral cortex, as verified by high TBA-RS levels relative to controls (Halliwell and Gutteridge 1999). The *in vitro* lipid peroxidation induced by 3HTA, which presented the most pronounced effects on TBA-RS levels as compared to 3HDA and 3HPA, was partially prevented by trolox (TRO) and deferoxamine (DFO), but not by melatonin (MEL), reduced glutathione (GSH), the nitric oxide synthase inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or a combination of the antioxidant enzymes catalase (CAT) plus superoxide dismutase (SOD). TRO is a hydrophilic analogue of vitamin E, the major lipid soluble antioxidant of lipoproteins and biomembranes, and appears to be effective against peroxy radicals (Halliwell and Gutteridge 2007). On the other hand, DFO forms a complex with iron (chelator), which subsequently cannot be reduced to the ferrous form (Fe²⁺) thus rendering the Fenton reaction impossible (Gutteridge et al. 1979). The data indicate that iron and peroxy radical were probably involved in 3HTA-elicited increase of TBA-RS levels. On the other hand, it is unlikely that the radicals

hydroxyl, mainly scavenged by MEL (Reiter, 1998), superoxide and hydrogen peroxide, scavenged by CAT plus SOD, respectively, and nitric oxide, which synthesis is inhibited by L-NAME, mediated 3HTA-induced *in vitro* lipid peroxidation .

We also verified that the content of protein carbonyl, the most general and widely used marker of protein oxidation both *in vitro* and *in vivo* (Stadtman and Berlett 1997), was markedly augmented by 3HTA and 3HPA, but not by 3HDA. Carbonyl groups (aldehydes and ketones) are mainly produced by oxidation of protein side chains (especially Pro, Arg, Lys, and Thr), by oxidative cleavage of proteins, or from the reaction of reducing sugars or their oxidation products with lysine protein residues (Dalle-Donne et al. 2003). Generally, detection of elevated levels of protein carbonyl is a sign not only of protein oxidative damage but also of protein dysfunction (Dalle-Donne et al. 2009). Although protein carbonyls are usually caused by ROS-mediated protein damage, we cannot also exclude the possibility that aldehydes resulting from lipid peroxidation may also induce carbonyl generation (Dalle-Donne et al. 2003).

Similarly, but in a lesser degree, sulfhydryl content was decreased by 3HTA and 3HPA. As most cellular sulfhydryl groups are protein-bound (Reznick and Packer 1994; Levine et al. 2002), it is conceivable that these results allied to carbonyl formation strongly indicate that 3HTA and 3HPA provoke protein oxidation with possible deleterious effects on protein functioning.

3HTA and 3HPA also decreased GSH levels, the major brain antioxidant defense, in cerebral cortex, suggesting that the rat cortical antioxidant defenses were impaired by these fatty acids (Lissi et al. 1995; Halliwell and Gutteridge 1999;

Evelson et al. 2001). It was also found that DFO, but not MEL, TRO, L-NAME or CAT plus SOD, were able to prevent 3HTA-decrease of GSH levels in cortical supernatants, implying that an iron-dependent effect may be involved in the decrease of the reduced GSH levels provoked by 3HTA.

In contrast, 3HTA and 3HPA did not oxidize a cell free commercial solution of GSH, indicating that these fatty acids provoked lipid and protein oxidative damage via free radical induction, rather than exerting a direct oxidative effect on this purified antioxidant. This assumption is further strengthened by the findings that antioxidants attenuated or prevented the lipid oxidative damage and the reduction of GSH levels induced by 3HTA.

Although we cannot at present establish which reactive species were responsible for the oxidative effects detected, it could be postulated that oxygen derived free radicals were mainly involved since L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthase, did not prevent the 3HDA, 3HTA and 3HPA-increase of lipid oxidative damage and the decrease of antioxidant defenses and that did not elicit an increase of nitrite and nitrate production.

Our findings showing that the long chain 3-hydroxy fatty acids accumulating in LCHAD and MTP deficiencies, especially 3HTA and 3HPA, provoke lipid and protein oxidative damage and reduced brain antioxidant defenses is indicative that they cause oxidative stress in cerebral cortex *in vitro* (Halliwell and Gutteridge 1999). In this scenario, we emphasize that the brain has a low capacity to react against free radicals because it has lower antioxidant defenses compared to other tissues.

At the present, although we cannot establish the pathophysiological significance of our present data since brain concentrations of the long chain 3-hydroxy fatty acids in patients affected by LCHAD and MTP deficiencies are unknown, it is feasible that our results are important. In this scenario, we emphasize that 3HDA, 3HTA and 3HPA provoked significant alterations of the oxidative stress parameters at micromolar doses similar to those found in plasma of patients affected by LCHAD and MTP deficiencies (Martínez et al. 1997; Roe and Ding 2001). Moreover, considering that the enzymes of fatty acid oxidation are expressed in the neural cells (Tyni et al. 2004), it is feasible that the brain concentrations of the accumulating metabolites may dramatically increase in these patients during metabolic crises due to the blockage of the enzymatic step catalyzed by LCHAD or MTP (Martínez et al. 1997; Roe and Ding 2001).

In conclusion, we describe for the first time that metabolites accumulating in LCHAD and MTP deficiencies, particularly 3HTA and 3HPA, induce lipid and protein oxidative damage and decrease the antioxidant defenses in rat brain *in vitro*. In case the present findings are confirmed *in vivo* in tissues of patients affected by LCHAD and MTP deficiencies, we presume that excessive reactive species generation might contribute, at least in part, to the neuropathology of these disorders. Therefore, antioxidants may possibly represent an adjuvant therapy for these patients especially during crises to avoid brain oxidative damage.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq, PRONEX II, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS, and FINEP research grant Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00, INCT-EN.

References

Aksenov M. Y., Markesbery W.R., 2001. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 302, 141–145.

Barschak, A. G., Sitta, A., Deon, M., de Oliveira Marques, M. H., Haeser, A., Dutra-Filho, C. S., Wajner, M., Vargas, C. R., 2006. Evidence that oxidative stress is increased in plasma from patients with maple syrup urine disease. *Metabolic Brain Disease* 21, 279-286.

Behl, C., Moosmann, B., 2002. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biological Chemistry* 383, 521–536.

Berg, D., Youdim, M. B., 2006. Role of iron in neurodegenerative disorders. *Topics in Magnetic Resonance Imaging* 17, 5-17.

Bogdanov, M. B., Andreassen, O. A., Dedeoglu, A., Ferrante, R. J., Beal, M. F., 2001. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry* 79, 1246-1249.

Browne, R. W., Armstrong, D., 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods in Molecular Biology* 108, 347-352.

Costa, C G., Dorland, L., Holwerda, U., de Almeida I. T., Poll-The B. T., Jakobs, C., Duran, M., 1998. Simultaneous analysis of plasma free fatty acids and their 3-hydroxy analogs in fatty acid beta-oxidation disorders. *Clinical Chemistry* 44, 463-71.

den Boer, M.E., Wanders, R.J., Morris, A.A., IJlst, L., Heymans, H.S., Wijburg, F.A., 2002. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients. *Pediatrics* 109(1), 99-104.

de Oliveira Marques, F., Hagen, M.E., Pederzoli, C. D., Sgaravatti, A. M., Durigon, K., Testa, C. G., Wannmacher, C. M., de Souza Wyse, A. T., Wajner, M., Dutra-Filho, C. S., 2003. Glutaric acid induces oxidative stress in brain of young rats. *Brain Research* 964, 153-158.

Dalle-Donne, I., Carini, M., Orioli, M., Vistoli, G., Regazzoni, L., Colombo, G., Rossi R., Milzani, A., Aldini, G., 2009. Protein carbonylation: 2,4-dinitrophenylhydrazine reacts with both aldehydes/ketones and sulfenic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 46, 1411-1419.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329, 23-38.

Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 186, 407-421.

Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S., Lissi, E. A., 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 388, 261-266.

Gregersen, N., Andresen, B.S., Corydon, M.J., Corydon, T.J., Olsen, R.K., Bolund, L., Bross, P., 2001. Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation defects: Exemplified by acyl-CoA dehydrogenase deficiencies, with special focus on genotype-phenotype relationship. *Human Mutation* 18(3), 169-89.

Gutteridge, J.M., Richmond, R., Halliwell B., 1979. Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochemical Journal* 184, 469-72.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C., 1999. Detection of free radicals and others reactive species: trapping and fingerprinting. In: Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (Ed.) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, pp. 351–425.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 2007. Oxygen is a toxic gas – an introduction to oxygen toxicity and reactive species. In: Halliwell, B., Gutteridge, J. M. .C. (Ed.) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-29.

Jackon, S., Kler, K., Bartlett, H., Briggs, H., Bindoff, L. A., Pourfazam, M., Gardner-Medwin, D., Turnbull, D. M., 1992. Combined enzyme defect of mitochondrial fatty acid oxidation. *The Journal of Clinical Investigation* 90, 1219-1225.

Jones, P. M., Burlina, A. B., Bennett, M. J., 2000. Quantitative measurement of total and free 3-hydroxy fatty acids in serum or plasma samples: short-chain 3-hydroxy fatty acids are not esterified. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 23, 745-750.

Jones, P. M., Butt, Y. M., Bennett, M. J., 2003. Effects of odd-numbered medium-chain fatty acids on the accumulation of long-chain 3-hydroxy-fatty acids in long-chain L-3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase and mitochondrial trifunctional protein deficient skin fibroblasts. *Molecular Genetics and Metabolism* 81(2), 96-9.

Leipnitz, G., Solano, A. F., Seminotti, B., Amaral, A. U., Fernandes, C. G., Beskow, A. P., Dutra-Filho, C. S., Wajner, M., 2009. Glycine provokes lipid oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in brain cortex of young rats. *Cellular & Molecular Neurobiology* 29, 253-61.

Levine, R. L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 790–796.

Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., del Castillo, M. D., 1995. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 153-158.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

Mancuso, M., Coppede, F., Migliore, L., Siciliano, G., Murri, L., 2006. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* 10, 59-73.

Martínez, G., Jiménez-Sánchez, G., Divry, P., Vianey-Saban, C., Riudor, E., Rodés, M., Briones, P., Ribes, A., 1997. Plasma free fatty acids in mitochondrial fatty acid oxidation defects. *Clinica Chimica Acta* 267, 143-154.

Miranda, K. M., Espey, M. G., Wink, D. A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 1, 62-71.

Perez-Severiano, F., Rios, C., Segovia, J., 2000 . Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Research* 862, 234-237.

Reiter, R. J., 1998. Melatonin, active oxygen species and neurological damage. *Drug News & Perspectives* 11, 291-296.

Reznick, A. Z., Packer. L., 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology* 233, 357-63.

Roe, C.R., Coates P.M., 1989. Acyl-CoA dehydrogenase deficiencies. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (eds) *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*. McGraw-Hill, New York, pp 889–914.

Roe, C. R., Ding, J., 2001. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (Ed.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 1909–1963.

Schuck, P. F., Ceolato, P. C., Ferreira, G. C., Tonin, A., Leipnitz, G., Dutra-Filho, C. S., Latini, A., Wajner, M., 2007. Oxidative stress induction by cis-4-decenoic acid: relevance for MCAD deficiency. *Free Radical Research* 41, 1261-1272.

Schuck, P.F., Ferreira, G.C., Moura, A. P., Busanello, E. N., Tonin, A.M., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., 2009. Medium-chain fatty acids accumulating in MCAD

deficiency elicit lipid and protein oxidative damage and decrease non-enzymatic antioxidant defenses in rat brain. *Neurochemistry International* 54, 519-25.

Sgaravatti, A. M., Sgarbi, M. B., Testa, C. G., Durigon, K., Pederzoli, C. D., Prestes, C. G., Wyse, A. T., Wannmacher, C. M., Wajner, M., Dutra-Filho, C. S., 2007. γ -Hydroxybutyric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Neurochemistry International* 50, 564-570.

Spiekerkoetter, U., Bennett, M.J., Ben-Zeev, B., Strauss, A.W., Tein, I., 2004. Peripheral neuropathy, episodic myoglobinuria, and respiratory failure in deficiency of the mitochondrial trifunctional protein. *Muscle & Nerve* 29(1), 66-72.

Stadtman, E. R., Berlett, B. S., 1997. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chemical Research in Toxicology* 10, 485-94.

Stoy, N., Mackay, G. M., Forrest, C. M., Christofides, J., Egerton, M., Stone, T. W., Darlington, L. G., 2005. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry* 93, 611-623.

Tyni, T., Palotie, A., Viinikka, L., Valanne, L., Salo, M.K., von Döbeln, U., Jackson, S.,

Wanders, R., Venizelos, N., Pihko, H., 1997. Long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency with the G1528C mutation: clinical presentation of thirteen patients. *Journal of Pediatrics* 130(1), 67-76.

Tyni, T., and Pihko, H., 1999. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatrica* 88, 237–245.

Tyni, T., Paetau, A., Strauss, A.W., Middleton, B., Kivelä, T., 2004. Mitochondrial fatty acid beta-oxidation in the human eye and brain: implications for the retinopathy of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatric Research* 56, 744-750.

Legends to Figures

Figure 1. *In vitro* effect of 3-hydroxydodecanoic (3HDA) (A), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) (B) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) (C) acids on thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) levels in rat cerebral cortex homogenates. In some experiments the antioxidants melatonin (MEL; 100 μ M), trolox (TRO; 5 μ M), the nitric oxide synthase inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 200 μ M), a combination of the antioxidant enzymes catalase (CAT; 10 mU/mL) plus superoxide dismutase (SOD; 10 mU/mL), deferoxamine (DFO; 150 μ M) or reduced glutathione (GSH) were added simultaneously with 100 μ M 3HTA to the incubation medium and TBA-RS levels measured afterwards (D). Values are mean \pm standard error of the mean for five independent experiments performed in triplicate. TBA-RS levels were calculated as nmol/mg protein and are expressed as percentage of controls. Controls did not contain the tested fatty acids. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 relative to controls; # P < 0.05 relative to 3HTA alone (Duncan multiple range test).

Figure 2. *In vitro* effect of 3-hydroxydodecanoic (3HDA) (A), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) (B) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) (C) acids on carbonyl content in rat cerebral cortex homogenates. Values are mean \pm standard error of the mean for five independent experiments performed in triplicate. Carbonyl content were calculated as nmol/mg protein and are expressed as percentage of controls. Controls did not contain the tested fatty acids. *** P < 0.001 relative to controls (Duncan multiple range test).

Figure 3. *In vitro* effect of 3-hydroxydodecanoic (3HDA) (A), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) (B) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) (C) acids on sulphhydryl content in rat cerebral cortex homogenates. Values are mean \pm standard error of the mean for five independent experiments performed in triplicate. Sulphydryl contents were calculated as nmol/mg protein and are expressed as percentage of controls. Controls did not contain the tested fatty acids. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ relative to controls (Duncan multiple range test).

Figure 4. *In vitro* effect of 3-hydroxydodecanoic (3HDA) (A), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) (B) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) (C) acids on reduced glutathione (GSH) levels. In some experiments the antioxidants melatonin (MEL; 100 μ M), trolox (TRO; 5 μ M), the nitric oxide synthase inhibitor N ^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 200 μ M), a combination of the antioxidant enzymes catalase (CAT; 10 mU/mL) plus superoxide dismutase (SOD; 10 mU/mL) or deferoxamine (DFO; 150 μ M) were added simultaneously with 100 μ M 3HTA to the incubation medium and GSH levels measured afterwards (D). Values are mean \pm standard error of the mean for five independent experiments performed in triplicate. GSH levels were calculated as nmol/mg protein and are expressed as percentage of controls. Controls did not contain the tested fatty acids. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ relative to controls; # $P < 0.05$ compared to 3HTA (Duncan multiple range test).

Figure 1.

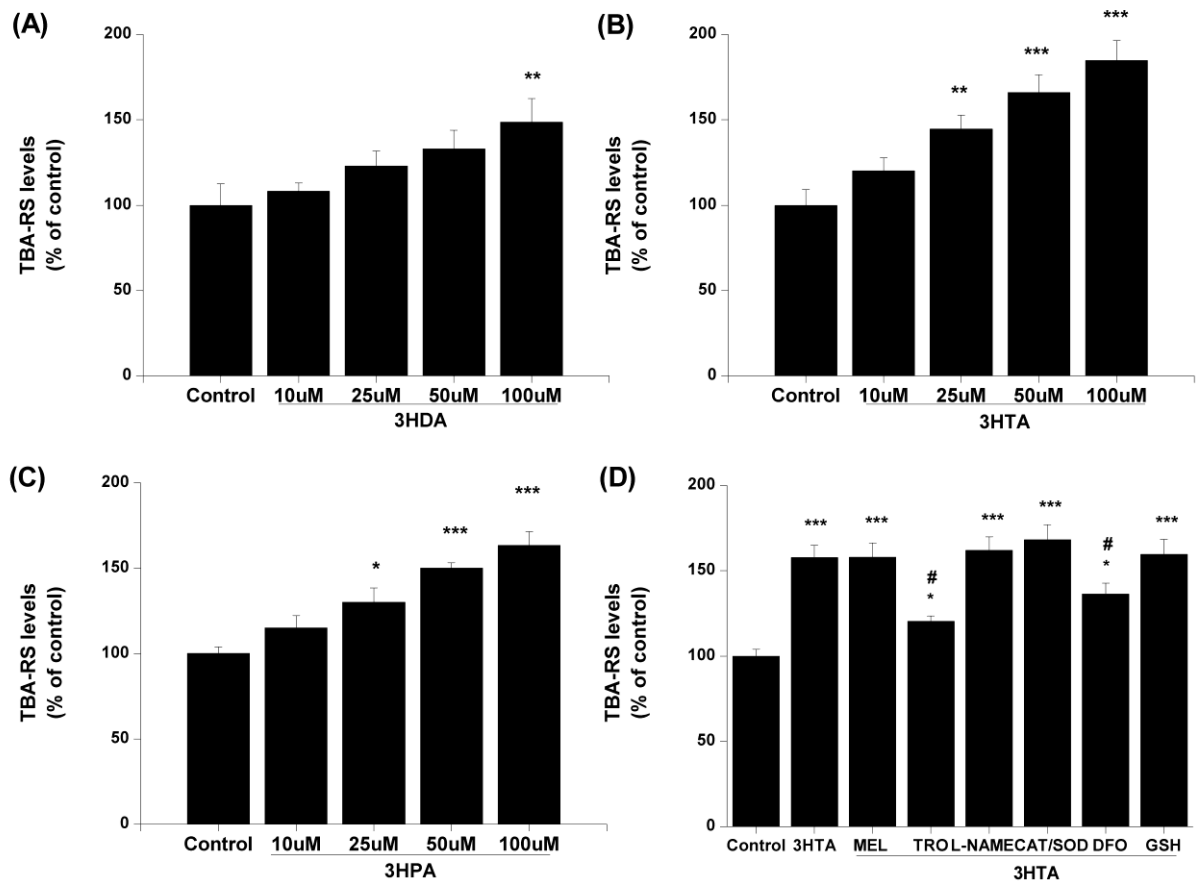


Figure 2.

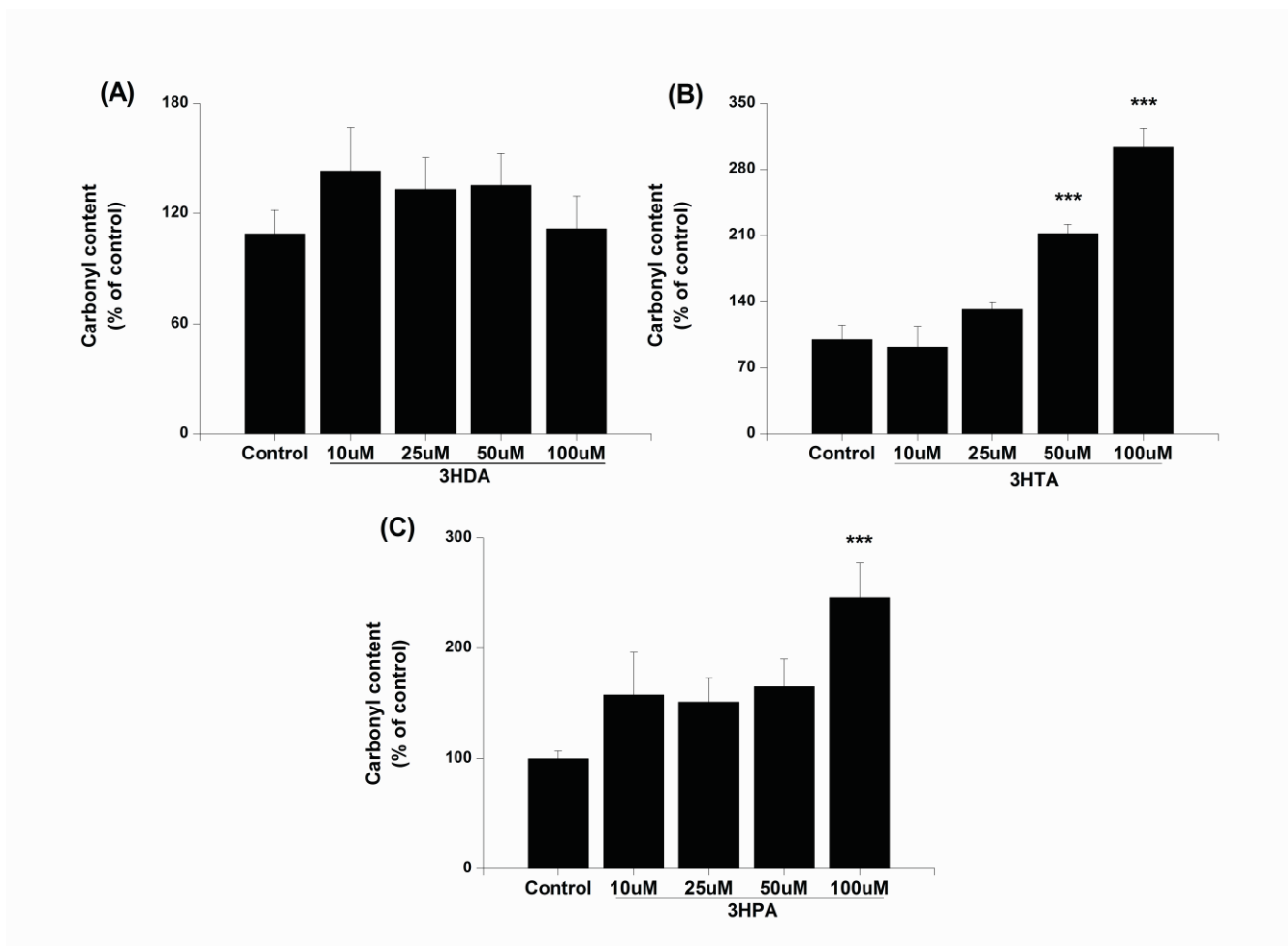


Figure 3.

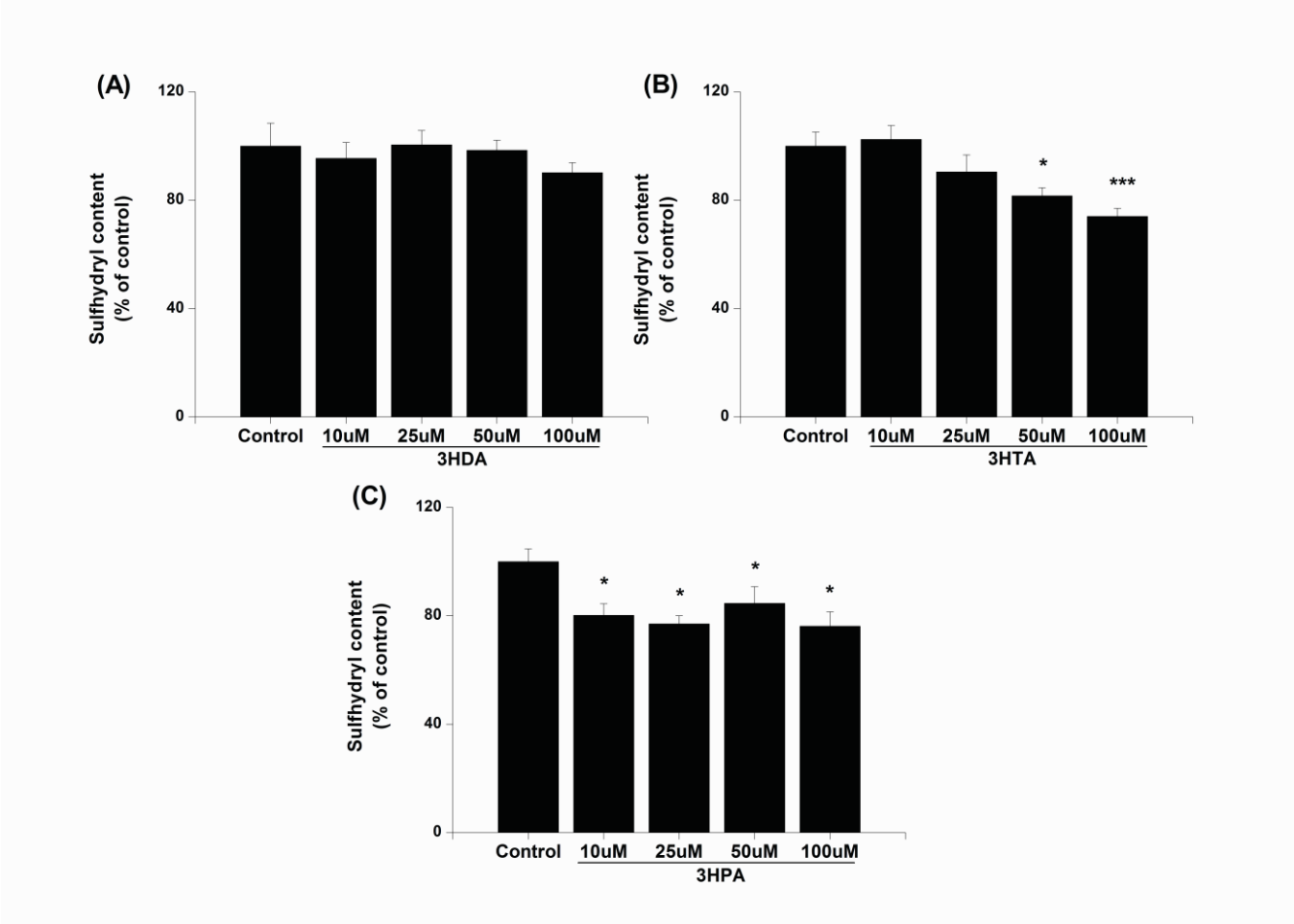


Figure 4.

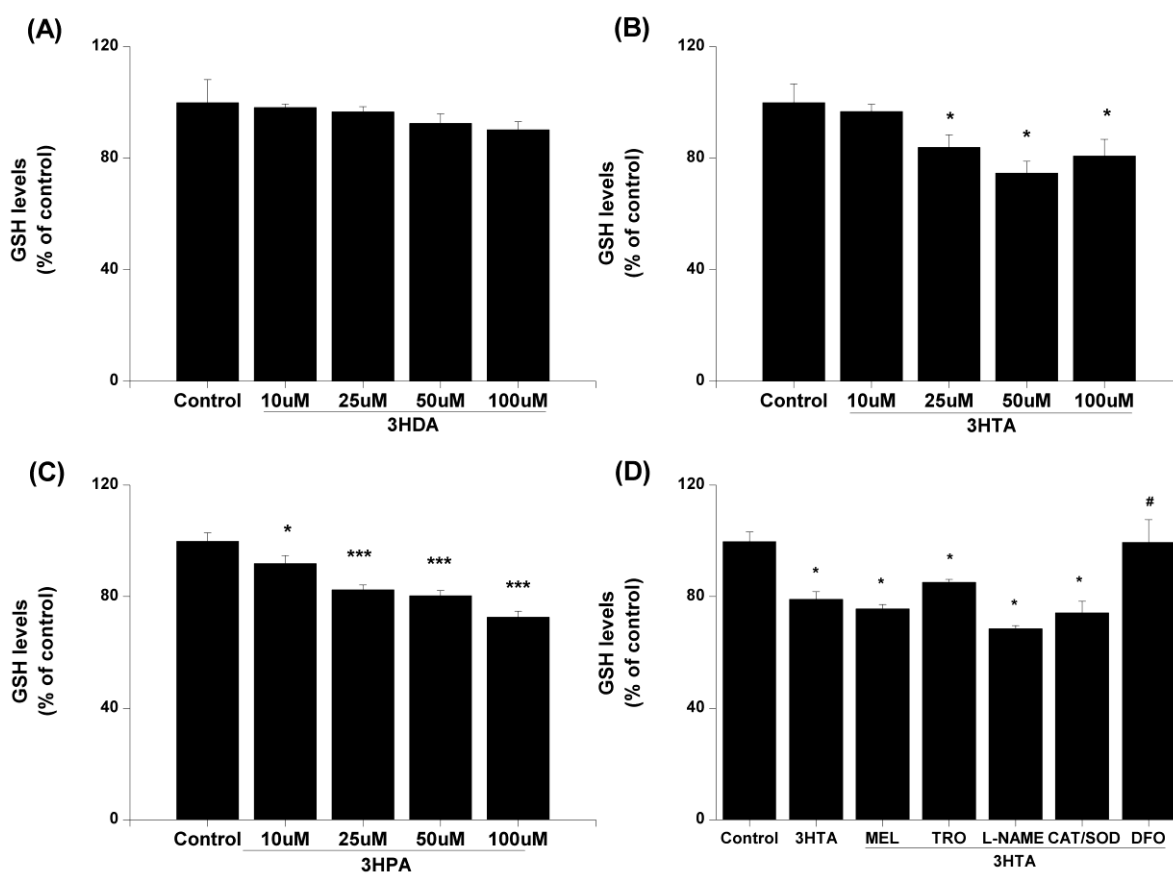


Table I. Effect of 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on a commercial solution of reduced glutathione (GSH).

Groups	GSH levels
Control	100 ± 4.38
100 µM 3HTA	95.6 ± 4.51
100 µM 3HPA	107.4 ± 3.79

A commercial solution of 200 mM GSH was exposed to 100 µM of 3HTA or 3HPA for 60 min at 37 °C, after which GSH content was measured. Values are mean ± standard error of the mean for three independent experiments performed in triplicate and are expressed as percentage of control.

Capítulo II

***Disturbance of mitochondrial energy homeostasis caused by the metabolites
accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain***

Anelise Miotti Tonin, Gustavo da Costa Ferreira, Mateus Grings, Carolina Maso
Viegas, Estela Natacha Busanello, Alexandre Umpierrez Amaral, Ângela Zanatta,
Patrícia Fernanda Schuck, Moacir Wajner

**Disturbance of mitochondrial energy homeostasis caused by the metabolites
accumulating in LCHAD and MTP deficiencies in rat brain**

Anelise M. Tonin¹, Gustavo C. Ferreira¹, Mateus Grings¹, Carolina M. Viegas¹,
Estela N. Busanello¹, Alexandre U. Amaral, Ângela Zanatta¹, Patrícia Fernanda
Schuck^{1,3}, Moacir Wajner^{1,2}

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil.

³Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde, Universidade do
Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil.

Corresponding Author: M. Wajner, Departamento de Bioquímica, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo, CEP 90035-
003, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +55 51 33085571. Fax: +55 51 33085539, E-
mail: mwajner@ufrgs.br

Abstract

Mitochondrial trifunctional protein (MTP) and isolated long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiencies are inborn errors of metabolism of fatty acid oxidation. Affected patients present tissue accumulation of the long chain 3-hydroxy fatty acids 3-hydroxydodecanoic (3HDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids. Clinical presentation is characterized by a multiorgan involvement, with cardiomyopathy, retinopathy, peripheral neuropathy, as well as severe CNS impairment with encephalopathic crises with lethargy, coma and seizures, besides mental retardation, whose pathophysiology is poorly known. In the present work, we investigated the in vitro effects of 3HDA, 3HTA and 3HPA on various parameters of energy homeostasis in mitochondrial preparations from brain of young rats. We found that 3HDA, 3HTA and 3HPA markedly increased state 4 respiration and diminished the respiratory control ratio using glutamate plus malate or succinate as substrates. 3HTA and 3HPA also diminished the mitochondrial membrane potential and the matrix NAD(P)H levels. In addition, 3HTA decreased ADP/O ratio and state 3 respiration, using malate but not pyruvate/malate or succinate as substrates. Our data indicate that the long chain 3-hydroxy fatty acids that accumulate in LCHAD/MTP deficiencies act as uncouplers of oxidative phosphorylation, while 3HTA also behaves as a metabolic inhibitor. It is presumed that impairment of brain energy homeostasis caused by these endogenous compounds may contribute at least in part to the neuropathology of LCHAD/MTP deficiencies.

Keywords: Long-chain 3-hydroxy fatty acids; LCHAD deficiency; mitochondrial function, rat brain

Introduction

The mitochondrial trifunctional protein (MTP) defects have recently emerged as an important group of inborn errors of metabolism of fatty acid oxidation because of their clinical implications. Human inherited defects in the MTP complex, that encompass three enzyme activities, cause either isolated long chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency, with normal or partially reduced thiolase and hydratase activity, or complete MTP deficiency with markedly reduced activity of all three enzymes (Rinaldo et al. 1998; Kompare and Rizzo 2008). Patients have been described with either MTP deficiency or more commonly with an isolated LCHAD deficiency. The biochemical hallmarks of this group of disorders are severe episodes of hypoketotic hypoglycemia, lactic acidemia and accumulation of long-chain 3-hydroxy fatty acids such as 3-hydroxydodecanoic (3HDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids in tissues and body fluids of affected individuals, especially during prolonged fasting or infection (Costa et al. 1998; Olpin et al. 2000; Hintz et al. 2001; Sander et al. 2005). It is interesting to note that lactic acid accumulation indicates mitochondrial dysfunction and a patient with LCHAD deficiency was initially diagnosed as a respiratory chain defect (Das et al. 2000). Clinically, affected patients may present encephalopathy with seizures, lethargy, coma mental retardation, microcephaly, hypotonia, as well as hepatic dysfunction, and/or skeletal and cardiac myopathy or sudden death (Tyni et al. 1996; Tyni and Pihko 1999; den Boer et al. 2002, Spiekerkoetter et al. 2009). Current management of patients with MTP or LCHAD defects include long-term dietary therapy of fasting avoidance, low-fat/high-

carbohydrate diet with restriction of long-chain fatty acid intake and replacement with medium-chain fatty acids (Roe and Ding 2001; Jones et al. 2003).

Hypoglycemia has been originally suggested as the main mechanism of brain damage in MTP/LCHAD deficiencies. On the other hand, it was demonstrated that the coma and brain edema may occur in the absence of low blood glucose levels, implying that the accumulating compounds could be potentially neurotoxic (Scriver et al. 2001; Gregersen et al. 2008). In this context, there are a few studies describing toxic in vitro effects of fatty acids and their derivatives, most related to impairment of distinct steps of energy metabolism. Long chain acyl-CoA esters have been shown to inhibit oxidative phosphorylation (Ventura et al. 2005), the mitochondrial ATP/ADP and dicarboxylate carriers, as well as respiratory chain enzymes (Ventura et al. 2006). These fatty acids were also shown to induce oxidative stress in the brain (data not published). However, knowledge of the pathogenic processes in LCHAD and MTP deficiencies is still underdeveloped.

We therefore investigated in the present work, the effect of 3HDA, 3HTA and 3HPA on important parameters of mitochondrial bioenergetics in the brain, including states 3 and 4 of mitochondrial respiration, the respiratory control ratio (RCR) and the ADP/O ratio assessed by oxygen consumption, as well as mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and NAD(P)H content in brain mitochondrial preparations from young rats.

Experimental Procedure

Reagents

All chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), except for 3HDA and 3HTA that were purchased from Indofine Chemical Company, Hillsborough, New Jersey, United States of America. 3HDA, 3HTA and 3HPA were dissolved on the day of the experiments in the incubation medium used for each technique with pH adjusted to 7.4. The final concentrations of these fatty acids in the medium ranged from 25 μM to 100 μM . Controls did not contain such acids in the incubation medium.

Animals

Wistar rats obtained from the Central Animal House of the Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS were used. Rats were kept with dams until weaning at 21 days of age. The animals had free access to water and to a standard commercial chow and were maintained on a 12:12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ($22\pm 1^\circ\text{C}$) colony room. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication no. 80-23, revised 1996) were followed in all experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Preparation of mitochondrial fractions

Forebrain mitochondria were isolated from 30-day-old rats as described (Rosenthal et al. 1987), with slight modifications. Animals were sacrificed by decapitation, had their brains rapidly removed and put into ice-cold isolation buffer containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.1% bovine serum albumin (BSA; free fatty acid) and 10 mM HEPES, pH 7.2. The cerebellum, pons, medulla and olfactory bulbs were removed and the remaining material was used as the forebrain. The forebrain was cut into small pieces using surgical scissors, extensively washed to remove blood and homogenized 1:10 in a Dounce homogenizer using both a loose-fitting and a tight-fitting pestle. The homogenate was centrifuged for 3 min at 2,000 x g. After centrifugation, the supernatant was again centrifuged for 8 min at 12,000 x g. The pellet was suspended in 20 mL of isolation buffer containing 10 μ L of 10% digitonin and centrifuged for 8 min at 12,000 x g. The supernatant was discarded and the final pellet gently washed and suspended in isolation buffer devoid of EGTA, at an approximate protein concentration of 25-35 mg . mL⁻¹. This preparation results in a mixture of synaptosomal and non-synaptosomal mitochondria similar to the general brain composition.

We always carried out parallel experiments with various blanks (controls) in the presence or absence of 3HDA, 3HTA e 3HPA and also with or without mitochondrial preparations in the reaction medium in order to detect any interference (artifacts) of this fatty acid on the techniques utilized to measure the mitochondrial parameters.

Respiratory parameters determined through mitochondrial oxygen consumption

The rate of oxygen consumption and the ADP/O ratio were measured polarographically using a Clark-type electrode in a thermostatically controlled (37°C) and magnetically stirred incubation chamber. 3HDA, 3 HTA and 3HPA (25 – 100µM) were added to the reaction medium at the beginning of the assay. The assay was performed with purified mitochondrial preparations (0.75 mg protein . mL⁻¹ when 2.5 mM malate plus 2.5 mM glutamate or 10mM pyruvate plus 2.5mM malate were used as substrates, and 0.50 mg protein. mL⁻¹ when succinate was used as substrate) incubated in a buffer containing 0.3 M sucrose, 5 mM MOPS, 5 mM potassium phosphate, 1 mM EGTA and 0.1% BSA. State 3 respiration was measured after addition of 1 mM ADP to the incubation medium. In order to measure state 4 respiration, 1 µg . mL⁻¹ oligomycin A was added to the incubation medium. Some experiments were carried out in the presence of 1 µM atractyloside (ATC), an inhibitor of adenine nucleotide translocator (ANT). The respiratory control ratio (RCR; state 3/state 4) was then calculated. States 3 and 4 were expressed as nmol O₂ consumed . min⁻¹ . mg of protein⁻¹. The ADP/O ratio was estimated according to Estabrook (1967), using 100 µM ADP in the incubation medium. Only mitochondrial preparations with RCR higher than 5 were used in the experiments.

Determination of mitochondrial inner membrane potentials ($\Delta\Psi_m$)

Mitochondrial inner membrane potentials ($\Delta\Psi_m$) were estimated according to Akerman and Wikström (1976) and Kowaltowski et al. (2002) using mitochondria

(0.50 mg protein. mL⁻¹) supported by 2.5 mM glutamate plus 2.5 mM malate or 5 mM succinate as substrates, in the presence of 1 µg . mL⁻¹ oligomycin A. The fluorescence of 5 µM cationic dye safranin O at an excitation wavelength of 495 nm and emission wavelength of 586 nm on a Hitachi F-4500 spectrofluorometer were followed during 5 minutes. Data were expressed as fluorescence arbitrary units (FAU).

Determination of NAD(P)H Fluorescence

Matrix mitochondrial NAD(P)H autofluorescence was measured at 37°C using 366 nm excitation and 450 nm emission wavelengths on a Hitachi F-4500 spectrofluorometer using mitochondrial preparations (0.5 mg protein . mL⁻¹) in an incubation medium containing 125 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 0.1 mg. mL⁻¹ BSA, 5 mM HEPES, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.3, using 2.5 mM malate plus 2.5 mM glutamate as substrates. Some experiments were carried out in the presence of 1 µM carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone (CCCP). Data were expressed as nmol NAD(P)H . mg of protein⁻¹.

Protein Determination

Protein was measured by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Statistical Analysis

Results were presented as mean ± standard deviation. Assays were performed in duplicate and the mean was used for statistical analysis. Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post-hoc

Duncan multiple range test when F was significant. Only significant F values were shown in the text. Differences between groups were rated significant at $P < 0.05$. All analyses were carried out using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software.

Results

This study used mitochondrial preparations from rat brain to identify possible alterations provoked by 3HDA, 3HTA and 3HPA, since these preparations allow reliable analysis of bioenergetic parameters and manipulations of experimental conditions not possible with whole brain.

We first determined the influence of 3HDA, 3HTA and 3HPA on respiratory parameters assessed by the rate of oxygen consumption (Figures 1 and 2). It can be observed in the figures that rat brain mitochondria incubated under our conditions were fully coupled, as indicated by the higher respiratory rates observed in the presence of ADP (state 3), as compared to those obtained after the addition of the ADP synthase inhibitor oligomycin A (state 4). We found that all fatty acids increased state 4 respiration regardless of the substrate used up to 240% [glutamate/malate: 3HDA: $F(3,16) = 5.40$; $P < 0.01$; 3HTA: $F(3,12) = 6.26$; $P < 0.01$; 3HPA: $F(3,12) = 60.8$; $P < 0.001$; succinate: 3HDA: $F(4,15) = 5.43$; $P < 0.05$; 3HTA: $F(4,15) = 36.12$; $P < 0.05$; 3HPA: $F(5,18) = 7.03$; $P < 0.001$]. In addition, 3HDA, 3HTA and 3HPA significantly diminished the RCR [glutamate/malate: 3HDA: $F(3,12) = 8.34$; $P < 0.01$; 3HTA: $F(3,12) = 8.56$; $P < 0.01$; 3HPA: $F(3,12) = 91.33$; $P < 0.001$; succinate: 3HDA: $F(4,15) = 37.41$; $P < 0.05$; 3HTA: $F(4,15) = 37.60$; $P < 0.05$; 3HPA: $F(5,18) = 66.75$; $P < 0.001$]. In contrast, state 3 respiration

and ADP/O ratio were decreased in 20% and 24%, respectively, only by 3HTA in the presence of glutamate plus malate as substrates [state 3: $F(3,12) = 9.66$; $P < 0.001$; ADP/O ratio: $F(4,15) = 5.55$; $P < 0.05$], but not when succinate was used as substrates. Furthermore, when pyruvate plus malate were used as substrates 3HTA did not alter state 3 respiration (results not shown). These experiments suggest that 3HDA, 3HTA and 3HPA behave as uncouplers of the oxidative phosphorylation and that 3HTA may also act as a metabolic inhibitor, decreasing the efficiency of mitochondrial respiration.

In order to better characterize the uncoupling effect of 3HDA, 3HTA and 3HPA on oxidative phosphorylation, mitochondrial membrane potentials ($\Delta\Psi_m$) were measured using the fluorescent probe safranin O. We observed that 3HTA and 3HPA, but not, 3HDA significantly decreased $\Delta\Psi_m$ in state 4-respiring mitochondria using glutamate plus malate (Figure 3) or succinate (Figure 4) as substrates.

We then assessed oxygen consumption in the presence of the ANT inhibitor ATC (1 μM) in order to examine the mechanism through which these fatty acids uncouples mitochondria. We observed that the stimulatory effect of 3HTA on oxygen consumption was not prevented by ATC [$F(3,12) = 22.93$; $P < 0.001$] (Figure 5), ruling out a selective mitochondrial membrane permeabilization via ANT in the 3HTA-elicited uncoupling effect.

The next step of our investigation was to evaluate whether 3HDA, 3HTA and 3HPA could alter matrix NAD(P)H content, since uncouplers of the oxidative phosphorylation provoke a reduction of the mitochondrial matrix NAD(P)H pool. It

was observed that 3HTA and 3HPA, but not 3HDA, provoked an immediate drop in the NAD(P)H autofluorescence (Figure 6). The addition of CCCP to the incubation medium at the end of the trace provoked a further reduction in matrix NAD(P)H autofluorescence, indicating that these fatty acids, at the highest tested concentration, did not elicit maximal uncoupling of the oxidative phosphorylation.

We also assessed the mitochondrial swelling in the presence of 3HDA, 3HTA and 3HPA following light scattering of the mitochondrial suspensions. We found that these fatty acids did not affect mitochondrial swelling under our experimental conditions (data not shown).

Discussion

Very little is known about the mechanisms underlying the neuropathology of mitochondrial trifunctional protein (MTP) and isolated long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiencies. However, it has been recently proposed that the accumulating fatty acids, such as 3-hydroxydodecanoic (3HDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids, and their derivatives may play an important role in the pathophysiology of these disorders (Gregersen et al. 2008).

Although the pathomechanisms of tissue damage in LCHAD deficiency are so far unknown, lactic acidemia, inhibition of various complexes of the respiratory chain and mitochondrial morphological abnormalities observed in patients affected by these diseases indicate mitochondrial dysfunction (Tyni et al. 1996; Ventura et al. 1998; Das et al. 2000).

Previous reports demonstrated that some long chain acyl-CoA derivatives inhibit ATP synthesis and oxygen consumption (under state 3) in liver mitochondria (Ventura et al. 2005). Therefore, in the present work we investigated the effect of 3HDA, 3HTA and 3HPA on a wide spectrum of brain bioenergetic parameters in the hope to clarify the mechanisms through which these fatty acids disturb mitochondrial homeostasis.

Initially, it was observed that 3HDA, 3HTA and 3HPA significantly increased state 4 respiration and decreased RCR at low micromolar concentrations. In addition, 3HTA and 3HPA decreased $\Delta\Psi_m$ and matrix NAD(P)H levels in state 4-respiring mitochondria, similarly but to a lesser extent than the classical uncoupler CCCP. Our data suggest that these fatty acids behave as uncouplers of oxidative phosphorylation. We also observed that the adenine nucleotide translocator (ANT) inhibitor atractyloside (ATC) did not prevent the increase in the rate of oxygen consumption in state 4-respiring mitochondria elicited by 3HTA, implying that the involvement of ANT in 3HTA-uncoupling effect, as previously shown for other fatty acids (Brustovetsky et al., 1990; Skulachev, 1998; Samartsev et al., 2000), is unlikely. In this context, interaction with other anion transporters, with mitochondrial membrane phospholipids, or a distortion of the packing of the lipids in the inner mitochondrial membrane leading to alterations in fluidity and ion permeability (Kimmelberg and Pahadjopoulos, 1974; Lee, 1976; Abeywardena et al., 1983; Schonfeld and Struy, 1999; Skulachev, 1999; Mokhova and Khailova, 2005) may possibly underlie the uncoupling effect promoted by this compound.

On the other hand, only 3HTA was able to decrease state 3 respiration and ADP/O ratio in the presence of glutamate plus malate but not of pyruvate plus

malate as substrate, suggesting that the oxidative system is also impaired by this fatty acid. These data suggest that the inhibition of state 3 respiration elicited by this fatty acid using glutamate plus malate as substrate may be secondary to impaired transport or oxidation of glutamate into the mitochondrial matrix. Interestingly, it has been demonstrated that long-chain acyl-CoA esters inhibit glutamate and succinate transport, ATP synthesis and oxygen consumption (state 3) in rat liver mitochondria (Ventura et al. 2005). Therefore, more studies should be carried out in order to clarify whether glutamate oxidation or transport are involved in the 3HTA-elicited state 3 reduction leading to a disturbance of mitochondrial homeostasis.

We cannot establish at present the exact pathophysiological relevance of our data since brain 3HDA, 3HTA and 3HPA concentrations are not yet established in these diseases. It is possible however that our present data showing that major long chain 3-hydroxy acids accumulating in LCHAD/MTP deficiencies compromise mitochondrial homeostasis (oxidative phosphorylation) may explain the lactic acidosis, alterations of the respiratory chain complexes activities and mitochondrial abnormalities described in patients affected by LCHAD/MTF deficiencies. Furthermore, it should be stressed that these fatty acids, particularly 3HTA, provoked an impairment of some parameters of mitochondrial homeostasis at similar concentrations to those found in plasma (Martínez et al. 1997; Jones et al. 2000) of affected patients. Moreover, considering that the enzymes of fatty acid oxidation are expressed in the neural cells (Reichmann et al. 1988; Tyni et al. 2004), it is feasible that the concentrations of the accumulating metabolites may dramatically increase in these patients during metabolic crises due to the blockage

of the enzymatic step catalyzed by LCHAD or MTP (Martínez et al. 1997; Roe and Ding 2001; Halldin et al. 2007). The present data therefore reinforce the hypothesis that intramitochondrial accumulation of fatty acids and their derivatives may be involved in the pathological findings found in these diseases (Ventura et al. 1998).

Conclusion

In conclusion, according to our knowledge we showed for the first time that 3HDA, 3HTA and 3HPA, which accumulate in LCHAD/ MTP deficiencies, provoke mitochondrial dysfunction by acting as uncouplers and 3HTA also as a metabolic inhibitor of the oxidative phosphorylation. We speculate that these effects could exacerbate the energy deficit caused due to the defect in fatty acid oxidation, impairing gluconeogenesis and leading to the occurrence of severe hypoglycemia and lactic acidosis. It is therefore presumed that our present findings could be involved in the cerebral abnormalities and neurological symptoms found in LCHAD/MTP patients.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq, PRONEX II, FAPERGS, PROPESQ/UFRGS, FAPESP and FINEP research grant Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net) # 01.06.0842-00, INCT-EN.

Conflict of Interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

Abeywardena MY, Allen TM, Charnock JS. Lipid-protein interactions of reconstituted membrane-associated adenosine triphosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta* 729, 62–74, 1983

Akerman KE, Wikström MK. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Letters* 68, 191-197, 1976

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 7(72), 248-254, 1976

Brustovetskiy NN, Dedukhova VI, Egoroval MV, Mokhova EN, Skulachev VP. Inhibitors of the ATP/ADP antiporter suppress stimulation of mitochondrial respiration and H⁺ permeability by palmitate and anionic detergents. *FEBS Letters* 272, 187-189, 1990

Costa CG, Dorland L, Holwerda U, de Almeida I T, Poll-The BT, Jakobs C, Duran M. Simultaneous analysis of plasma free fatty acids and their 3-hydroxy analogs in fatty acid beta-oxidation disorders. *Clinical Chemistry* 44, 463-471, 1998

Das AM, Fingerhut R, Wanders RJ, Ullrich K. Secondary respiratory chain defect in a boy with long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: possible diagnostic pitfalls. *European Journal of Pediatrics* 159(4), 243-246, 2000

den Boer ME, Wanders RJ, Morris AA, IJlst L, Heymans HS, Wijburg FA. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients. *Pediatrics* 109(1), 99-104, 2002

Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. In *Methods in Enzymology* RW. Estabrook ME. Pullman ed. Academic Press, New York, pp 41–47, 1967

Gregersen N, Andresen BS, Pedersen CB, Olsen RK, Corydon TJ, Bross P. Mitochondrial fatty acid oxidation defects-remaining challenges. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 31, 643-657, 2008

Halldin MU, Forslund A, von Döbeln U, Eklund C, Gustafsson J. Increased lipolysis in LCHAD deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 30(1), 39-46, 2007

Jones PM, Burlina AB, Bennett MJ. Quantitative measurement of total and free 3-hydroxy fatty acids in serum or plasma samples: short-chain 3-hydroxy fatty acids are not esterified. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 23: 745-750, 2000

Jones PM, Butt YM, Bennett MJ. Effects of odd-numbered medium-chain fatty acids on the accumulation of long-chain 3-hydroxy-fatty acids in long-chain L-3-

hydroxyacyl CoA dehydrogenase and mitochondrial trifunctional protein deficient skin fibroblasts. *Molecular Genetics and Metabolism*. 81(2):96-9, 2003

Kimmelberg H, Pahadjopoulos D. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na⁺,K⁺)-stimulated adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* 249, 1071–1080, 1974

Kompare M, Rizzo WB. Mitochondrial fatty-acid oxidation disorders. *Seminars in Pediatric Neurology* 15(3), 140-149, 2008

Kowaltowski AJ, Cosso RG, Campos CB, Fiskum G. Effect of Bcl-2 overexpression on mitochondrial structure and function. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 42802-42807, 2002

Lee AG. Model for action of local anesthetics. *Nature* 262, 545–548, 1976

Martínez G, Jiménez-Sánchez G, Divry P, Vianey-Saban C, Riudor E, Rodés M, Briones P, Ribes A. Plasma free fatty acids in mitochondrial fatty acid oxidation defects. *Clinica Chimica Acta* 267, 143-154, 1997

Mokhova EN, Khailova LS. Involvement of mitochondrial inner membrane anion carriers in the uncoupling effect of fatty acids. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 159-163, 2005

Olpin SE, Clark S, Andresen BS, Bischoff C, Olsen RK, Gregersen N, Chakrapani A, Downing M, Manning NJ, Sharrard M, Bonham JR, Muntoni F, Turnbull DN, Pourfarzam M. Biochemical, clinical and molecular findings in LCHAD and general mitochondrial trifunctional protein deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 28(4), 533-544, 2005

Reichmann H, Maltese WA, DeVivo DC. Enzymes of fatty acid beta-oxidation in developing brain. *Journal of Neurochemistry* 51(2), 339-44, 1988

Rinaldo P, Raymond K, Al-Odaib A, Bennett M. Clinical and biochemical features of fatty acid oxidation disorders. *Current Opinion in Pediatrics* 10, 615–621, 1998

Roe CR, Ding J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, ed. New York: McGraw-Hill, New York , pp 1909–1963, 2001

Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, Varghese PJ, Sharpe S. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 7, 752-758, 1987

Samartsev VN, Simonyan RA, Markova OV, Mokhova EN, Skulachev VP. Comparative study on uncoupling effects of laurate and lauryl sulfate on rat liver and skeletal muscle mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 145, 179-190, 2000

Sander J, Sander S, Steuerwald U, Janzen N, Peter M, Wanders RJ, Marquardt I, Korenke GC, Das AM. Neonatal screening for defects of the mitochondrial trifunctional protein. *Molecular Genetics and Metabolism* 85(2), 108-114, 2005

Schonfeld P, Struy H. Refsum disease diagnostic marker phytanic acid alters the physical state of membrane proteins of liver mitochondria. *FEBS Letters* 457, 179-183, 1999

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8^a edition. New York, McGraw-Hill. 3-45, 2001

Skulachev VP. Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 31, 431-445, 1999

Spiekerkoetter U, Lindner M, Santer R, Grotzke M, Baumgartner MR, Boehles H, et al. Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 32(4), 488-97, 2009

Tyni T, Majander A, Kalimo H, Rapola J, Pihko H. Pathology of skeletal muscle and impaired respiratory chain function in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency with the G1528C mutation. *Neuromuscular Disorders* 6, 327-337, 1996

Tyni T, Pihko H. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatrica*. 88:237–245, 1999

Tyni T, Paetau A, Strauss AW, Middleton B, Kivelä T. Mitochondrial fatty acid beta-oxidation in the human eye and brain: implications for the retinopathy of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatric Research* 56, 744-750, 2004

Ventura FV, Costa CG, Struys EA, Ruiten J, Allers P, Ijlst L, Tavares de Almeida I, Duran M, Jakobs C, Wanders RJ. Quantitative acylcarnitine profiling in fibroblasts using [U-13C] palmitic acid: an improved tool for the diagnosis of fatty acid oxidation defects. *Clinica Chimica Acta*, 281(1-2)1-17, 1999

Ventura FV, Ruiten J, Ijlst L, de Almeida IT, Wanders RJ. Differential inhibitory effect of long-chain acyl-CoA esters on succinate and glutamate transport into rat liver mitochondria and its possible implications for long-chain fatty acid oxidation defects. *Molecular Genetics and Metabolism* 86(3), 344-352, 2005

Ventura FV, Tavares de Almeida I, Wanders RJ. Inhibition of adenine nucleotide transport in rat liver mitochondria by long-chain acyl-coenzyme A beta-oxidation intermediates. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 352(4), 873-8, 2006

Legends of Figures

Figure 1. Effect of 3-hydroxydodecanoic (3HDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on oxygen consumption in non-ADP-stimulated (state 4) and ADP-stimulated (state 3) in mitochondria supported by glutamate plus malate (A and C) or succinate (B and D), respectively. Values are mean \pm standard deviation for four independent experiments and states 3 and 4 of mitochondrial respiration are expressed as $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to controls (Duncan multiple range test).

Figure 2. Effect of 3-hydroxydodecanoic (3HDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on respiratory control ratio (RCR) and on ADP/O ratio in mitochondria supported by glutamate plus malate (A and C) or succinate (B and D), respectively. Values are mean \pm standard deviation for four independent experiments and states 3 and 4 of mitochondrial respiration are expressed as $\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg of protein}^{-1}$. * $P < 0.05$ compared to controls (Duncan multiple range test).

Figure 3. Effect of 3-hydroxydodecanoic (3HDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on mitochondrial membrane potential using glutamate plus malate as substrate. CCCP (1 μM) was added at the end of the measurements. Traces are representative of four independent experiments and were expressed as fluorescence arbitrary units (FAU).

Figure 4. Effect of 3-hydroxydodecanoic (3HDA), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) acids on mitochondrial membrane potential using succinate as substrate. CCCP (1 μ M) was added at the end of the measurements. Traces are representative of four independent experiments and were expressed as fluorescence arbitrary units (FAU).

Figure 5. Effect of 3HTA on oxygen consumption in glutamate/malate-supported mitochondria respiring in state 4. After addition of mitochondrial preparation (0.7 mg protein \cdot mL⁻¹), 100 μ M was supplemented to the incubation medium in the presence or in the absence of 1 μ M atractyloside (ATC). Values are mean \pm standard deviation for four independent experiments and state 4 of mitochondrial respiration is expressed as nmol O₂ \cdot min⁻¹ \cdot mg of protein⁻¹. *** P <0.001 compared to controls (Duncan multiple range test).

Figure 6. Effect of 3-hydroxydodecanoic (3HDA) (A), 3-hydroxytetradecanoic (3HTA) (B) and 3-hydroxypalmitic (3HPA) (C) acids on mitochondrial NAD(P)H content using glutamate plus malate as substrates. Data were expressed as nmol NAD(P)H \cdot mg of protein⁻¹. Traces are representative of four independent experiments.

Figure 1.

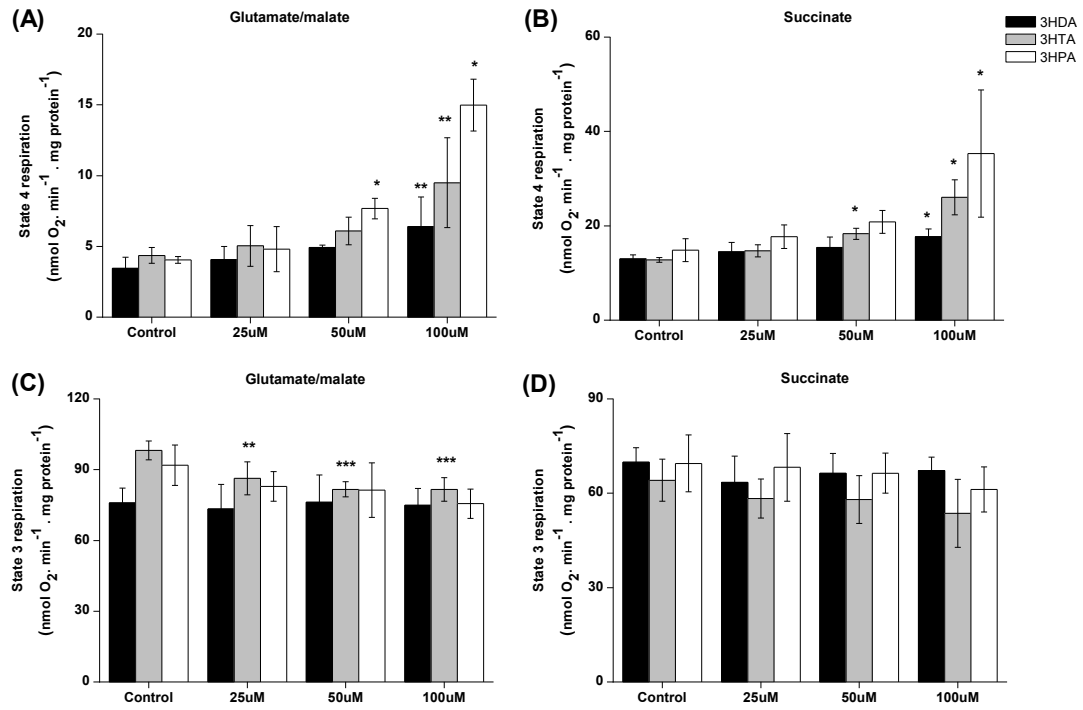


Figure 2.

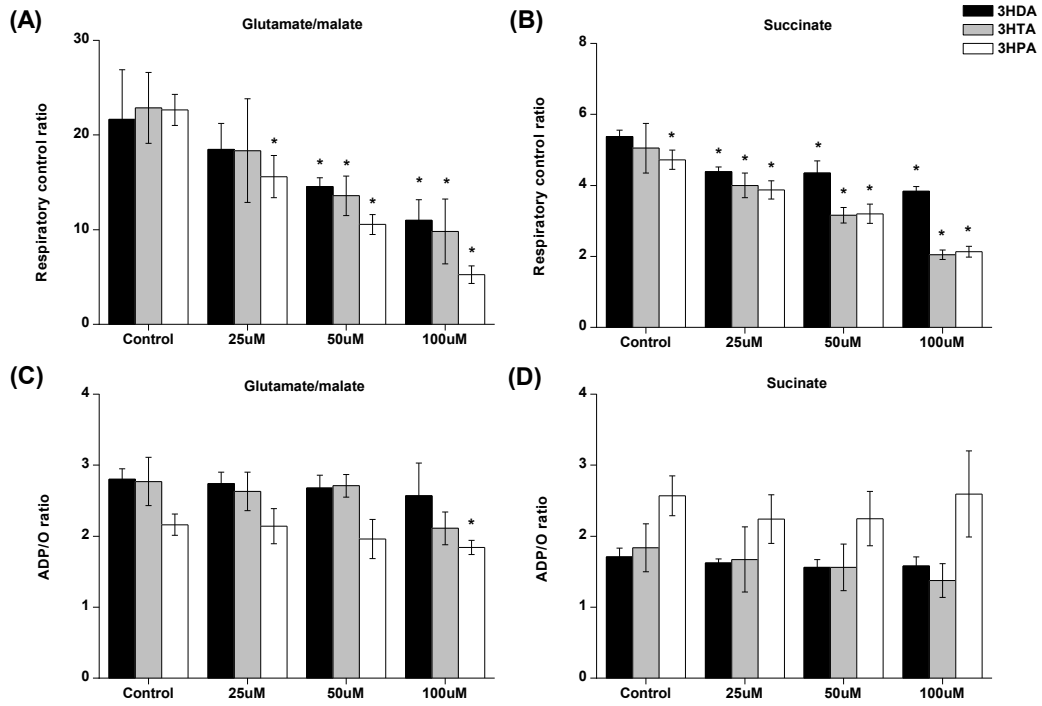


Figure 3.

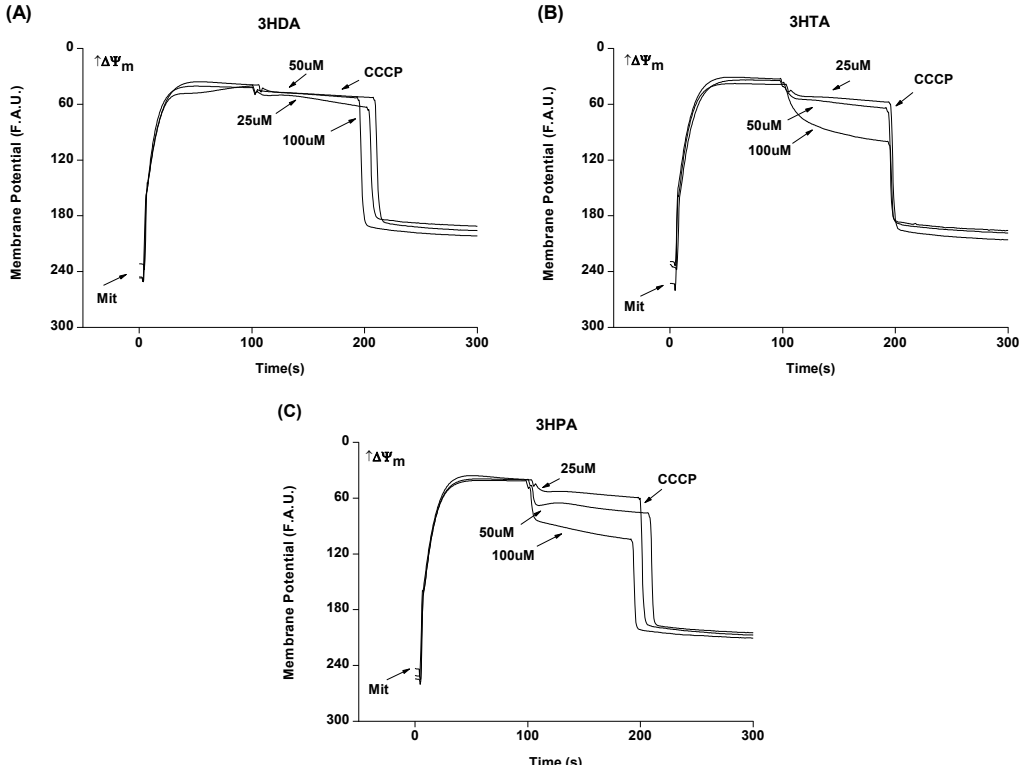


Figure 4.

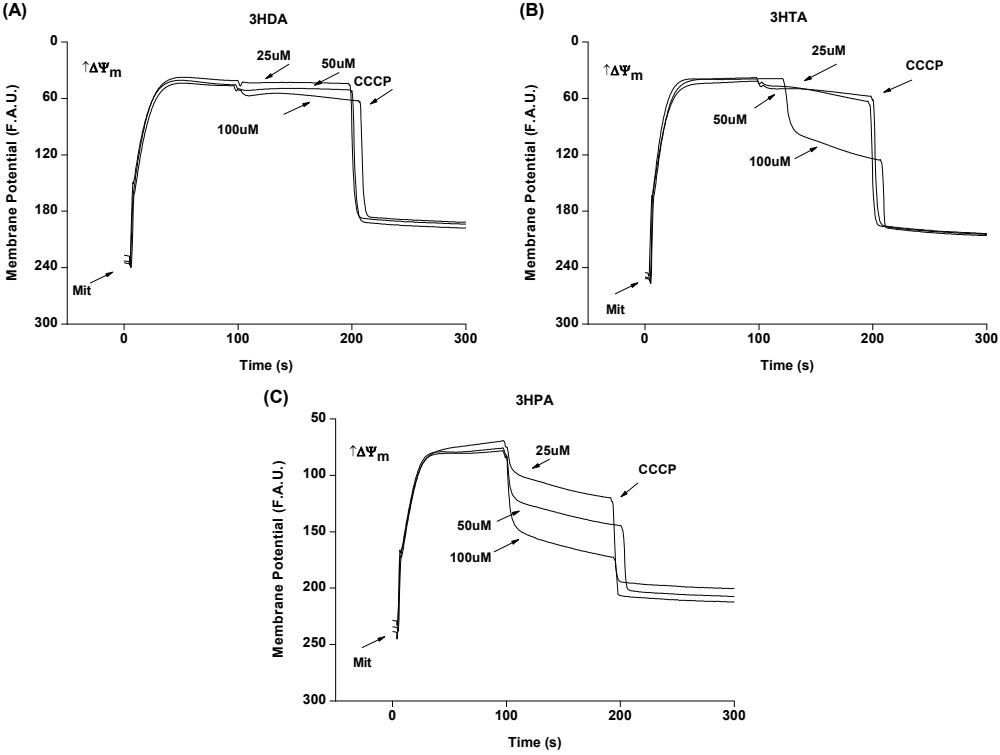


Figure 5.

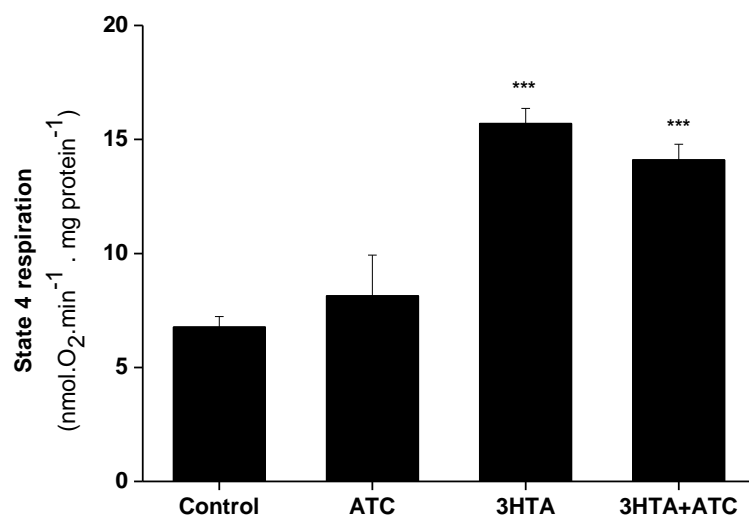
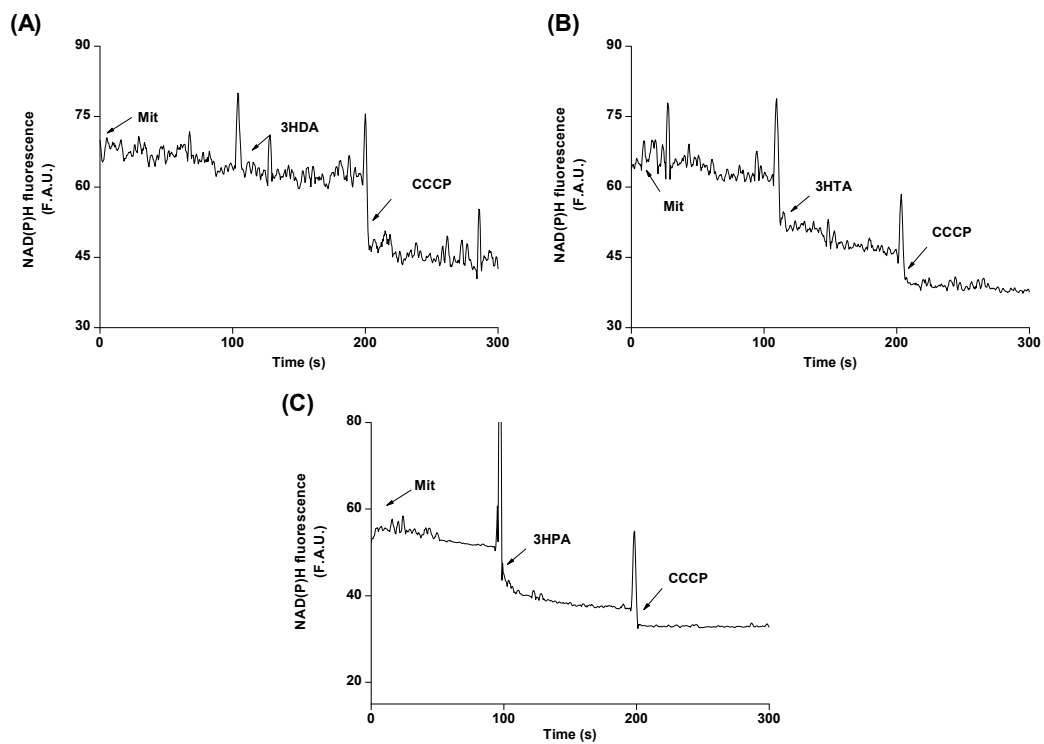


Figure 6.



PARTE III

Discussão e Conclusões

III.1. DISCUSSÃO

As deficiências da LCHAD e da MTP caracterizam-se clinicamente por hipoglicemia hipocetótica, convulsões, coma, letargia, neuropatia periférica, retinopatia, além de cardiopatia, disfunção hepática e morte súbita nos primeiros três anos de vida (Brackett et al. 1995), sendo fenotipicamente mais severos do que os outros distúrbios da β -oxidação de ácidos graxos. Pacientes afetados por esses defeitos também apresentam moderada a severa acidemia láctica, indicando disfunção mitocondrial. Embora os sintomas neurológicos sejam frequentes, pouco se sabe sobre os mecanismos fisiopatológicos do dano cerebral que acomete os pacientes portadores das deficiências de LCHAD/MTP. Alguns investigadores apontam a hipoglicemia e a síntese diminuída de corpos cetônicos como as principais causas do dano neurológico, embora outros presumem que os ácidos graxos acumulados nessas deficiências possuem ações neurotóxicas e estejam envolvidos na patofisiologia desses defeitos (Gregersen et al., 2008). Deve-se enfatizar que várias manifestações clínicas desta doença ocorrem na ausência de hipoglicemia, fortalecendo a hipótese de que os compostos acumulados possam atuar como agentes neurotóxicos.

Considerando que o cérebro é um órgão susceptível ao ataque de espécies reativas e que a mitocôndria desempenha um papel central na geração de energia para a homeostasia dos processos celulares através da manutenção dos níveis de ATP, bem como regulando as concentrações intracelulares de cálcio (Nicholls e Akerman, 1982) e que alterações mitocondriais, tais como inibições de complexos da cadeia respiratória, podem levar a um aumento na geração de espécies

reativas (Halliwell e Gutteridge, 2007), o presente trabalho teve por objetivos avaliar o efeito dos ácidos 3HDA, 3HTA e 3HPA, importantes metabólitos acumulados nas deficiências de LCHAD e MTP sobre alguns parâmetros de estresse oxidativo (capítulo I) e de função mitocondrial (capítulo II) em preparações mitocondriais obtidas de cérebro de ratos de 30 dias de vida.

Inicialmente, observamos que o 3HDA, 3HTA e 3HPA induziram um aumento importante na peroxidação lipídica em córtex cerebral de ratos, evidenciado pelo aumento nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). A medida de TBA-RS reflete a quantidade de malondialdeído (MDA) formado, que é um produto da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados de lipídios complexos. O MDA é altamente tóxico, já que reage com proteínas e bases do DNA, causando alterações nos resíduos de aminoácidos e provocando mutações (Halliwell e Gutteridge, 2007b).

Verificamos também que a indução *in vitro* de peroxidação lipídica pelo 3HTA, que provocou o maior aumento dos níveis de TBA-RS, comparado ao efeito dos outros ácidos, foi parcialmente prevenida pelos antioxidantes trolox (TRO) e deferoxamina (DFO), mas não por L-NAME, melatonina, GSH e a combinação de SOD com CAT. O trolox é um análogo hidrofílico da vitamina E, o principal antioxidante lipossolúvel de lipoproteínas e biomembranas, muito ativo contra radicais peroxila (Halliwell and Gutteridge, 2007a). Por outro lado, DFO forma um complexo com ferro, reduzindo a formação do íon ferroso (Fe^{2+}) e, portanto, a reação de Fenton, principal origem do radical hidroxila (Gutteridge *et al.*, 1979). Assim, os dados sugerem que íons ferro e as espécies reativas de oxigênio (ROS) peroxil estariam envolvidas no aumento de TBA-RS provocado pelo 3HTA. Por

outro lado, é pouco provável que superóxido e peróxido de oxigênio, sequestrados pela SOD e CAT, respectivamente, e óxido nítrico, cuja síntese é inibida por L-NAME, estejam envolvidos no aumento da lipoperoxidação induzida por esse ácido.

Verificamos ainda que o 3HTA e o 3HPA, mas não o 3HDA, aumentaram o conteúdo de carbonilas e diminuíram o conteúdo de grupamentos sulfidríla. Esses resultados indicam que o 3HTA e o 3HPA induzem dano oxidativo protéico. A dosagem do conteúdo de grupamentos carbonila é amplamente utilizada como marcador de dano oxidativo protéico utilizado tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Stadtman and Berlett, 1997). A formação de grupos carbonila (aldeídos e cetonas) é uma modificação não-enzimática irreversível principalmente produzida por oxidação de cadeias laterais de proteínas (especialmente prolina, argina, lisina e triptofano), por clivagem oxidativa de proteínas, ou a partir de reações de açúcares redutores bem como de seus produtos de oxidação com resíduos de lisina (Dalle-Donne et al., 2003). Embora a carbonilação de proteínas seja usualmente causada por dano oxidativo induzido por espécies reativas, nós não podemos excluir a possibilidade de que aldeídos resultantes da peroxidação lipídica possam também induzir a geração de carbonilas (Dalle-Donne et al., 2003).

Neste contexto, é importante salientar que a maior parte dos equivalentes tiólicos nas proteínas é encontrada na forma reduzida e que tem sido proposto que esses grupamentos (PSH) são tão importantes quanto a GSH na manutenção do estado redox celular. Isso é possível porque, por um lado, os grupamentos sulfidrílas de proteínas constituem um “pool” maior que os grupamentos sulfidrílas da GSH e, por outro lado, porque durante a exposição a algum oxidante (radicais

livres, por exemplo), os PSH podem ser reversivelmente oxidados formando pontes dissulfeto (PSSP) ou derivados glutationilados (PSSG), sendo reduzidos e regenerados após o restabelecimento do estado redox normal da célula (Hansen et al., 2009). Dessa forma, a oxidação de grupamentos sulfidrila causada pelos ácidos orgânicos estudados representa tanto dano protéico quanto diminuição das defesas antioxidantes não-enzimáticas no córtex cerebral. Enfatize-se também que a oxidação dos grupos sulfidrila de determinadas proteínas (resíduos de cisteína específicos) geram dissulfetos, alterando o estado redox de proteínas e causando a sua inativação (Kuhn et al., 1999).

Além disso, o 3HTA e o 3HPA diminuíram significativamente os níveis de glutathiona reduzida (GSH), o principal antioxidante não-enzimático presente no cérebro. Considerando que este parâmetro é usado para avaliar a capacidade de um tecido em prevenir e responder ao dano associado a radicais livres (Lissi *et al.*, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999; Evelson *et al.*, 2001), pode-se concluir que as defesas antioxidantes do córtex cerebral de ratos são comprometidas por estes ácidos graxos. Outros experimentos demonstraram que a diminuição dos níveis de GSH provocada pelo 3HTA foi totalmente prevenida por DFO, reforçando a idéia de um envolvimento de ferro e da reação de Fenton nesse efeito.

Por outro lado, observamos que os ácidos graxos testados não foram capazes de oxidar uma solução comercial de GSH na ausência de homogeneizado cortical no meio de incubação, sugerindo que estes compostos não atuam diretamente como agentes pró-oxidantes e tampouco que nossos achados de redução dos níveis de GSH pudessem ser devidos a artefatos (reação dos ácidos com reagentes utilizados na determinação dos níveis de GSH, etc). Por

outro lado, considerando esses achados e também que antioxidantes foram capazes de prevenir parcial ou totalmente os efeitos do 3HTA, presumimos que a indução da oxidação lipídica e proteica pelos ácidos de cadeia longa hidroxilada acumulados nas deficiências de LCHAD e MTP ocorreram provavelmente através da formação de radicais livres por esses ácidos.

Outra parte de nossa investigação focou o efeito do 3HDA, 3HTA e 3HPA sobre alguns parâmetros mitocondriais medidos através de captação de oxigênio em preparações purificadas de mitocôndrias obtidas de córtex cerebral de ratos. Verificamos que esses metabólitos aumentaram o estado 4 da respiração mitocondrial e diminuíram os valores do índice de controle respiratório (RCR) quando glutamato/malato ou succinato foram usados como substratos, indicando que os mesmos atuam como desacopladores da fosforilação oxidativa.

Muitos trabalhos demonstraram que o translocador de nucleotídeos adenina (ANT) está envolvido no efeito desacoplador de alguns ácidos graxos, e que neste caso esse efeito poderia ser prevenido pela co-incubação com atractilosídeo (ATC) (Brustovetsky et al., 1990; Skulachev, 1998; Samartsev et al., 2000). Assim, na tentativa de esclarecer o mecanismo pelo qual o AcD exerce seu efeito desacoplador, testamos o efeito da co-incubação de AcD e ATC sobre o consumo de oxigênio. Observamos que o efeito desacoplador do AcD não foi alterado pela presença de ATC, indicando que este ácido graxo provavelmente atue por um mecanismo distinto de outros ácidos graxos, não interferindo no ANT. Uma possível explicação para estes achados seria a de que o AcD afeta a bicamada lipídica da membrana mitocondrial, levando a uma alteração na fluidez,

permeabilidade a íons e interação de fosfolipídeos (Kimmelberg e Pahadjopoulos, 1974; Lee, 1976; Abeywardena, Allen e Charnock, 1983).

O 3HTA e o 3HPA também diminuíram significativamente o potencial de membrana mitocondrial com ambos substratos testados, bem como o conteúdo de equivalentes reduzidos de NAD(P)H na matriz mitocondrial, o que pode ser explicado por um efeito desacoplador causado por esses compostos, visto que desacopladores dissipam o potencial de membrana, levando a um aumento do consumo de equivalentes reduzidos para a manutenção do potencial.

Além disso, o 3HTA diminuiu o estado 3 da respiração em concentrações tão baixas quanto 25 μM e a razão ADP/O na concentração de 100 μM , quando utilizado glutamato/malato, mas não succinato como substrato, indicando que este ácido funciona como um inibidor metabólico com provável prejuízo na fosforilação oxidativa. No entanto, o 3HTA não alterou o estado 3, quando piruvato/malato foram utilizados como substratos da fosforilação oxidativa, indicando que o efeito desse ácido no estado fosforilante (com acréscimo de ADP no meio de incubação) possa ter sido devido ao transporte e/ou oxidação mitocondrial do glutamato. Tendo em vista que alguns ésteres de acil-CoA de cadeia longa hidroxilada inibem o transporte de glutamato e succinato pela membrana mitocondrial interna em preparações mitocondriais de fígado de ratos, reduzindo a síntese de ATP e o consumo de oxigênio (estado 3) (Ventura et al., 2005), presumimos que a oxidação do glutamato esteja comprometida pelo 3HTA. Entretanto, no presente trabalho não investigamos esse aspecto que certamente merece ser elucidado em estudos posteriores.

Com base nestes dados, podemos sugerir que o 3HTA comprometa a fosforilação oxidativa através de um efeito desacoplador e outro de inibição metabólica, com interferência em processos mitocondriais de oxidação.

Neste contexto, é possível que nossos achados demonstrando que o comprometimento da fosforilação oxidativa causada por ácidos hidroxilados de cadeia longa possam explicar, ao menos em parte, a acidemia láctica descrita em pacientes afetados pelas deficiências da LCHAD/MTP (Ventura et al., 1998; den Boer et al., 2002). Por outro lado, nossos dados reforçam a hipótese de que o acúmulo intramitocondrial de ácidos graxos e seus derivados hidroxilados possam estar envolvidos com os achados patológicos nestas doenças (Ventura et al., 1998). Apesar de não podermos precisar a relevância fisiopatológica dos presentes achados, deve-se enfatizar que os efeitos tóxicos aqui apresentados ocorreram em concentrações similares às aquelas encontradas em tecidos de pacientes afetados pela por essas deficiências durante as crises metabólicas em que ocorre um aumento significativo nas concentrações teciduais dos ácidos graxos de cadeia longa hidroxilada.

Considerando que a hipotonia e fraqueza muscular intensa e os achados musculares de rabdomiólise que são encontrados nos pacientes com as deficiências da LCHAD e da MTP e ainda que o suprimento energético adequado a partir de carboidratos e ácidos graxos de cadeia média previne e reverte esses sintomas, acreditamos que a redução da fosforilação oxidativa causada pelos ácidos graxos hidroxilados de cadeia longa seja responsável por esses achados clínicos. Não se pode também afastar a possibilidade de que a neuropatia periférica, retinopatia e os sintomas neurológicos característicos nas deficiências

LCHAD e MTP sejam devidos a efeitos tóxicos desses metabólitos ácidos acumulados. Deve-se considerar que as enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos, incluindo a MTP, são expressas no cérebro e retina. Portanto, é possível que nas deficiências de LCHAD e MTP exista acúmulo cerebral dos ácidos graxos acumulados nestas doenças. Enfatize-se ainda que ácidos graxos, tais como o ácido octanóico, inibem o efluxo de ácidos carboxílicos através do plexo coróide, além de serem capazes de lesar a barreira hematoencefálica. Se o mesmo ocorrer com o 3HDA, 3HTA e 3HPA que são produzidos no fígado em grandes quantidades, poderia-se supor que esses intermediários potencialmente podem lesar esta barreira e a partir do sangue penetrar no cérebro, acumulando-se neste tecido. Uma disfunção na barreira hematoencefálica, associada ao acúmulo desses metabólitos neurotóxicos, poderia contribuir para o coma e edema cerebral apresentado pelos pacientes.

Concluindo, os presentes resultados indicam que os principais metabólitos acumulados nas deficiências de LCHAD/MTP exercem efeitos neurotóxicos importantes e que os sintomas característicos dessa doença não podem ser exclusivamente devidos à hipoglicemia e diminuição da síntese de corpos cetônicos. Dessa forma, é possível que uma disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo, possivelmente aliados a outros mecanismos, atuem sinergicamente, levando ao dano neurológico apresentado pelos pacientes afetados por essas deficiências. Acreditamos, portanto, que os achados deste trabalho possam auxiliar na elucidação dos mecanismos fisiopatogênicos da neurodegeneração servindo como base para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas

relevantes no tratamento e na melhora da qualidade de vida dos indivíduos afetados.

III.2. CONCLUSÕES

- Os ácidos 3-hidroxiodecanóico (3HDA), 3-hidroxitetradecanóico (3HTA) e 3-hidroxi palmítico (3HPA), acumulados nas deficiências da proteína trifuncional mitocondrial (MTP) e da desidrogenase de hidroxiacil-CoA de cadeia longa (LCHAD), induziram lipoperoxidação (dano oxidativo lipídico determinado através do aumento da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos jovens.

- A lipoperoxidação induzida pelo 3HTA foi parcialmente prevenida pelos antioxidantes trolox e deferoxamina, indicando que radicais peroxila e íons ferro estariam envolvidas no aumento de TBA-RS provocado pelo 3HTA

- O 3HTA e o 3HPA provocaram dano oxidativo protéico, evidenciado pelo aumento da formação de grupamentos carbonila e da oxidação de grupamentos sulfidríla em homogeneizado córtex cerebral de ratos jovens.

- O 3HTA e o 3HPA também diminuíram significativamente as defesas antioxidantes não-enzimáticas evidenciado pela redução das concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em homogeneizado de córtex cerebral de ratos.

- A diminuição das concentrações de GSH causada pelo 3HTA em córtex cerebral de ratos jovens foi prevenida pela deferoxamina, indicando que íons ferro estariam envolvidas na diminuição das concentrações de GSH.

- Os ácidos 3HDA, 3HTA e 3HPA não alteraram a oxidação dos grupamentos tióis em uma solução comercial de GSH, sugerindo que esses compostos não atacam diretamente esses grupamentos.

- Os ácidos 3HDA, 3HTA e 3HPA não alteraram o conteúdo de nitratos e nitritos em homogeneizado de córtex cerebral de ratos, sugerindo que espécies reativas de nitrogênio não estão envolvidas nos efeitos pró-oxidantes desencadeados por estes ácidos graxos.

- Os ácidos 3HDA, 3HTA e 3HPA aumentaram o estado 4 e diminuíram o índice de controle respiratório (RCR), tanto quando glutamato/malato como quando succinato foram utilizados como substratos nas preparações mitocondriais de cérebro de ratos.

- 3HTA e 3HPA também diminuíram o potencial de membrana mitocondrial em preparações mitocondriais de cérebro de ratos de 30 dias de vida quando glutamato/malato ou succinato foram utilizados como substratos, comportando-se como desacopladores da fosforilação oxidativa.

- O translocador de nucleotídeos de adenina parece não estar envolvido no efeito desacoplador do 3HTA, visto que a presença de atractilosídeo não foi capaz de reverter o efeito desacoplador desse ácido.

- 3HTA e 3HPA também diminuíram o conteúdo de equivalentes reduzidos de NAD(P)H na matriz mitocondrial.

- 3HTA diminuiu o estado 3 da respiração quando utilizado glutamato/malato como substrato, mas não quando utilizado piruvato/malato ou succinato como substratos em preparações mitocondriais de cérebro de ratos

- 3HTA diminuiu a razão ADP/O quando utilizado glutamato/malato como substrato, mas não quando utilizado succinato como substratos em preparações mitocondriais de cérebro de ratos

Os metabólitos testados induziram estresse oxidativo e comprometeram a homeostase mitocondrial em córtex cerebral, mecanismos que podem estar envolvidos no dano neurológico apresentado pelos pacientes afetados pelas deficiências da MTP ou da LCHAD.

III.3. PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito *in vitro* do 3HTA sobre o transporte de substratos para dentro da mitocôndria em preparações mitocondriais de cérebro de ratos jovens.
- Avaliar os efeitos *in vitro* dos ácidos 3-hidroxidodecanóico (3HDA), 3-hidroxitetradecanóico (3HTA) e 3-hidroxipalmítico (3HPA) sobre parâmetros de estresse oxidativo em fígado e coração de ratos jovens.
- Avaliar os efeitos *in vivo* dos ácidos 3HDA, 3HTA e 3HPA sobre parâmetros de metabolismo energético e função mitocondrial em fígado e coração de ratos jovens.
- Avaliar os efeitos *ex vivo* dos ácidos 3HDA, 3HTA e 3HPA sobre processos de oxidações biológicas (estresse oxidativo) em córtex cerebral de ratos na presença ou ausência de neuroinflamação induzida pela administração inflamação sistêmica ou intracerebroventricular (neuroinflamação)

III.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeles RH, Frey PA, Jenks WP. *Biochemistry*. London: Jones and Bartlett, 603-632, 1992.

Abeywardena MY, Allen TM, Charnock JS. Lipid-protein interactions of reconstituted membrane-associated adenosine triphosphatases. *Biochimica et Biophysica Acta* 729, 62–74, 1983.

Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol*, 409-70, 2000.

Baric I, Furnic K, Hoffmann GF. Inborn errors of metabolism at the turn of the millennium. *Croat Med J* 42:379-383, 2001.

Barschak AG, Marchesan C, Sitta A, Deon M, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Maple syrup urine disease in treated patients: biochemical and oxidative stress profiles. *Clin Biochem* 41:317-24, 2008a.

Barschak AG, Sitta A, Deon M, Barden AT, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Oxidative stress in plasma from maple syrup urine disease patients during treatment. *Metab Brain Dis* 23:71-80, 2008b.

Beal MF. Mitochondria and neurodegeneration. *Novartis Found Symp* 287:183-92, 2007.

Behl C, Moosmann B. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol Chem* 383:521-536, 2002.

Ben-Shachar D, Karry R. Neuroanatomical pattern of mitochondrial complex I pathology varies between schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *PLoS ONE* 3:e3676, 2008.

Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65:1865-74, 1999.

Bickel, H. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme* 38:14-26, 1987.

Boveris A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B Aires)* 58:350-6, 1998.

Brustovetskiy NN, Dedukhova VI, Egoroval MV, Mokhova EN, Skulachev VP. Inhibitors of the ATP/ADP antiporter suppress stimulation of mitochondrial respiration and H⁺ permeability by palmitate and anionic detergents. *FEBS Letters* 272, 187-189, 1990.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29:222-30, 2000.

Costa CG, Dorland L, Holwerda U, de Almeida IT, Poll-The BT, Jakobs C, Duran M. Simultaneous analysis of plasma free fatty acids and their 3-hydroxy analogs in fatty acid beta-oxidation disorders. *Clin Chem* 44:463-71, 1998.

Das AM, Illsinger S, Lücke T, Hartmann H, Ruiter JP, Steuerwald U, Waterham HR, Duran M, Wanders RJ. Isolated mitochondrial long-chain ketoacyl-CoA thiolase deficiency resulting from mutations in the HADHB gene. *Clin Chem* 52(3):530-4,2006.

Dalle-Done I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 329: 23-38, 2003.

Delanty N, Dichter MA. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand* Sep 98:145-53, 1998.

den Boer ME, Wanders RJ, Morris AA, IJlst L, Heymans HS, Wijburg FA. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients. *Pediatrics*109(1), 99-104, 2002.

Deon M, Garcia MP, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Schimit GO, Pigatto M, Jardim LB, Wajner M, Giugliani R, Vargas CR. Hexacosanoic and docosanoic acids plasma levels in patients with cerebral childhood and asymptomatic X-linked adrenoleukodystrophy: Lorenzo's oil effect. *Metab Brain Dis* 23:43-9, 2008.

Deon M, Sitta A, Barschak AG, Coelho DM, Pigatto M, Schmitt GO, Jardim LB, Giugliani R, Wajner M, Vargas CR. Induction of lipid peroxidation and decrease of antioxidant defenses in symptomatic and asymptomatic patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Int J Dev Neurosci* 25:441-4, 2007.

Di Donato S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration, *J Inherit Metab Dis* 23:247– 263, 2000.

- Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 388: 261-266, 2001.
- Feksa LR, Latini A, Rech VC, Feksa PB, Koch GD, Amaral MF, Leipnitz G, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wannmacher CM. Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metab Brain Dis* 23:221-33, 2008.
- Ferreira GC, Tonin A, Schuck PF, Viegas CM, Ceolato PC, Latini A, Perry ML, Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM, Vargas CR, Wajner M. Evidence for a synergistic action of glutaric and 3-hydroxyglutaric acids disturbing rat brain energy metabolism. *Int J Dev Neurosci* 25:391-8, 2007.
- Gardner A, Salmaso D, Nardo D, Micucci F, Nobili F, Sanchez-Crespo A, Jacobsson H, Larsson SA, Pagani M. Mitochondrial function is related to alterations at brain SPECT in depressed patients. *CNS Spectr* 13:805-814, 2008.
- Gil JM, Rego AC. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 28:2156, 2008.
- Gregersen N, Andresen BS, Pedersen CB, Olsen RK, Corydon TJ, Bross P. Mitochondrial fatty acid oxidation defects-remaining challenges. *J Inherit Metab Dis* 31:643-657, 2008.
- Gu M, Owen AD, Toffa SE, Cooper JM, Dexter DT, Jenner P, Marsden CD, Schapira AH. Mitochondrial function, GSH and iron in neurodegeneration and Lewy body diseases. *J Neurol Sci* 158:24-9, 1998.

- Gutteridge JM, Richmond R, Halliwell B. Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem J.* 184:469-72, 1979.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (Ed.) *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, Oxford, 614-677, 2007.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. Detection of free radicals and others reactive species: trapping and fingerprinting. In: Halliwell B, Gutteridge JMC. (Ed.) *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press, Oxford, pp. 351–425, 1999.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142:231-55, 2004.
- Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141:312-22, 2006.
- Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18:685-716, 2001.
- Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 353:411-6, 2001.
- Hansen RE, Roth D, Winther JR. Quantifying the global cellular thiol-disulfide status. *PNAS* 106(2): 422-427, 2009.

Jones PM, Burlina AB, Bennett MJ. Quantitative measurement of total and free 3-hydroxy fatty acids in serum or plasma samples: short-chain 3-hydroxy fatty acids are not esterified. *J Inherit Metab Dis* 23: 745-750, 2000.

Kessler A, Biasibetti M, da Silva Melo DA, Wajner M, Dutra-Filho CS, de Souza Wyse AT, Wannmacher CM. Antioxidant effect of cysteamine in brain cortex of young rats. *Neurochem Res* 33:737-44, 2008.

Kimmelberg H, Pahadjopoulos D. Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on (Na⁺,K⁺)-stimulated adenosine triphosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* 249, 1071–1080, 1974

Kuhn DM, Aretha CW, Geddes TJ. Peroxynitrite Inactivation of Tyrosine Hydroxylase: Mediation by Sulfhydryl Oxidation, not Tyrosine Nitration. *J Neurosci* 19: 10289-10294, 1999.

Latini A, da Silva CG, Ferreira GC, Schuck PF, Scussiato K, Sarkis JJ, Dutra Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M. Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. *Mol Genet Metab* 86:188-99, 2005.

Latini A, Scussiato K, Leipnitz G, Gibson KM, Wajner M. Evidence for oxidative stress in tissues derived from succinate semialdehyde dehydrogenase-deficient mice. *J Inherit Metab Dis* 30:800-10, 2007.

Lee AG. Model for action of local anesthetics. *Nature* 262, 545–548, 1976

- Leipnitz G, Seminotti B, Amaral AU, de Bortoli G, Solano A, Schuck PF, Wyse AT, Wannmacher CM, Latini A, Wajner M. Induction of oxidative stress by the metabolites accumulating in 3-methylglutaconic aciduria in cerebral cortex of young rats. *Life Sci* 82:652-62, 2008.
- Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., del Castillo, M. D. (1995). Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biology and Medicine* 18: 153-158.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86:147-57, 1996.
- Lovell MA, Xie C, Markesbery WR. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 855:116-23, 2000.
- Markesbery WR, Carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 9:133-46, 1999.
- Matsubara Y, Narisawa K, Tada K. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: molecular aspects. *Eur J Pediatr* 151:154-9, 1992.
- Maxwell SR. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*.49:345-61, 1995.
- Méndez-Álvarez E, Soto-Otero R, Hermida-Aeijeiras A, López-Real AM, Labandeira-García JL. Effects of aluminium and zinc on the oxidative stress caused by 6-hydroxydopamine autoxidation: relevance for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1586:155-168, 2001.

Mirandola SR, Melo DR, Schuck PF, Ferreira GC, Wajner M, Castilho RF. Methylmalonate inhibits succinate-supported oxygen consumption by interfering with mitochondrial succinate uptake. *J Inherit Metab Dis* 31:44-54, 2008.

Moshal KS, Metreveli N, Frank I, Tyagi SC. Mitochondrial MMP activation, dysfunction and arrhythmogenesis in hyperhomocysteinemia. *Curr Vasc Pharmacol* 6:84-92, 2008.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of biochemistry*. 3^a ed. New York: Worth Publishers, 623-721, 2000.

Nicholls D, Akerman K. Mitochondrial calcium transport. *Biochim Biophys Acta* 683:57-88, 1982.

Nicholls DG, Ferguson SJ. The Chemiostatic proton circuit In: *Bioenergetics 3* (Nicholls DG, Ferguson SJ, eds), 57-87. Academic Press, London, 2002.

Nourooz-Zadeh J, Liu EH, Yhlen B, Anggård EE, Halliwell B. F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 72:734-40, 1999.

Reddy PH, Beal MF. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 14:45-53, 2008.

Regenold WT, Phatak P, Marano CM, Sassan A, Conley RR, Kling MA. Elevated cerebrospinal fluid lactate concentrations in patients with bipolar disorder and

schizophrenia: implications for the mitochondrial dysfunction hypothesis. *Biol Psychiatry* 65:489-494, 2009.

Reis de Assis D, Maria RC, Borba Rosa R, Schuck PF, Ribeiro CA, da Costa Ferreira G, Dutra-Filho CS, Terezinha de Souza Wyse A, Duval Wannmacher CM, Santos Perry ML, Wajner M. Inhibition of energy metabolism in cerebral cortex of young rats by the medium-chain fatty acids accumulating in MCAD deficiency. *Brain Res* 1030:141-151, 2004.

Ribeiro CA, Balestro F, Grando V, Wajner M. Isovaleric acid reduces Na⁺, K⁺-ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats. *Cell Mol Neurobiol* 27:529-40, 2007.

Ribeiro CA, Sgaravatti AM, Rosa RB, Schuck PF, Grando V, Schmidt AL, Ferreira GC, Perry ML, Dutra-Filho CS, Wajner M. Inhibition of brain energy metabolism by the branched-chain amino acids accumulating in maple syrup urine disease. *Neurochem Res* 33:114-24, 2008.

Rinaldo P, Raymond K, Al-Odaib A, Bennett M. Clinical and biochemical features of fatty acid oxidation disorders. *Curr Opin Pediatr* 10:615–621, 1998.

Roe CR, Ding J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds), 1909–1963, New York: McGraw-Hill, New York, 2001.

Reiter RJ. Melatonin, active oxygen species and neurological damage. *Drug News Perspect* 11: 291-296, 1998.

Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357-63, 1994.

Samartsev VN, Simonyan RA, Markova OV, Mokhova EN, Skulachev VP. Comparative study on uncoupling effects of laurate and lauryl sulfate on rat liver and skeletal muscle mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 145, 179-190, 2000.

Sander J, Sander S, Steuerwald U, Janzen N, Peter M, Wanders RJ, Marquardt I, Korenke GC, Das AM. Neonatal screening for defects of the mitochondrial trifunctional protein. *Molecular Genetics and Metabolism* 85(2), 108-114, 2005.

Shao L, Martin MV, Watson SJ, Schatzberg A, Akil H, Myers RM, Jones EG, Bunney WE, Vawter MP. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. *Ann Med* 40:281-295, 2008.

Sasaki S, Horie Y, Iwata M. Mitochondrial alterations in dorsal root ganglion cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 114:633-9, 2007.

Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1:1269, 1989.

Schapira AH, Mann VM, Cooper JM, Dexter D, Daniel SE, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease, *J Neurochem* 55:2142– 2145, 1990a.

Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 54:823–827, 1990b.

Schuck PF, Leipnitz G, Ribeiro CA, Dalcin KB, Assis DR, Barschak AG, Pulrolnik V, Wannmacher CM, Wyse AT, Wajner M. Inhibition of creatine kinase activity *in vitro* by ethylmalonic acid in cerebral cortex of young rats. *Neurochem Res* 27:1633-1639, 2002.

Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (Eds). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8^a edition. New York, McGraw-Hill. 3-45, 2001.

Sitta A, Barschak AG, Deon M, Terroso T, Pires R, Giugliani R, Dutra-Filho CS, Wajner M, Vargas CR. Investigation of oxidative stress parameters in treated phenylketonuric patients. *Metab Brain Dis* 21:287-96, 2006.

Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1363:100-124, 1998.

Smith CM, Marks AD, Lieberman MA. *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*, 2^a ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10: 485-94, 1997.

Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 63:381-389, 1988.

Tyni T, Majander A, Kalimo H, Rapola J, Pihko H. Pathology of skeletal muscle and impaired respiratory chain function in long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency with the G1528C mutation. *Neuromuscul Disord*. 6 :327-37, 1996.

Tyni T, Palotie A, Viinikka L, Valanne L, Salo MK, von Döbeln U, Jackson S, Wanders R, Venizelos N, Pihko H. Long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency with the G1528C mutation: clinical presentation of thirteen patients. *J Pediatr*. 130(1):67-76, 1997.

Ushikubo S, Aoyama T, Kamijo T, Wanders RJ, Rinaldo P, Vockley J, Hashimoto T. Molecular characterization of mitochondrial trifunctional protein deficiency: formation of the enzyme complex is important for stabilization of both alpha- and beta-subunits. *Am J Hum Genet* 58(5): 979-88, 1996.

Ventura FV, Costa CG, Struys EA, Ruiter J, Allers P, Ijlst L, Tavares de Almeida I, Duran M, Jakobs C, Wanders RJ. Quantitative acylcarnitine profiling in fibroblasts using [U-13C] palmitic acid: an improved tool for the diagnosis of fatty acid oxidation defects. *Clinica Chimica Acta*, 281(1-2)1-17, 1999.

Ventura FV, Ruiter J, Ijlst L, de Almeida IT, Wanders RJ. Differential inhibitory effect of long-chain acyl-CoA esters on succinate and glutamate transport into rat liver mitochondria and its possible implications for long-chain fatty acid oxidation defects. *Molecular Genetics and Metabolism* 86(3), 344-352, 2005.

Ventura FV, Tavares de Almeida I, Wanders RJ. Inhibition of adenine nucleotide transport in rat liver mitochondria by long-chain acyl-coenzyme A beta-oxidation intermediates. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 352(4), 873-8, 2006.

Viegas CM, da Costa Ferreira G, Schuck PF, Tonin AM, Zanatta A, de Souza Wyse AT, Dutra-Filho CS, Wannmacher CM, Wajner M. Evidence that 3-

hydroxyisobutyric acid inhibits key enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of young rats. *Int J Dev Neurosci* 26:293-9, 2008.

Walker V. Inherited organic acid disorders. In: Clayton BE, Round JM, eds. *Clinical Biochemistry and the Sick Child*. 131–43, Oxford: Blackwell, 1994.

Wanders RJ, Vreken P, den Boer ME, Wijburg FA, van Gennip AH, IJlst L. Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation. *J Inherit Metab Dis* 22(4): 442-87, 1999.

Wang JF. Defects of mitochondrial electron transport chain in bipolar disorder: implications for mood-stabilizing treatment. *Can J Psychiatry* 52:753-762, 2007.

Zugno AI, Scherer EB, Schuck PF, Oliveira DL, Wofchuk S, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT. Intrastratial administration of guanidinoacetate inhibits Na⁺, K⁺-ATPase and creatine kinase activities in rat striatum. *Metab Brain Dis* 21:41-50, 2006.

Zugno AI, Stefanello FM, Scherer EB, Mattos C, Pederzoli CD, Andrade VM, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS, Wyse AT. Guanidinoacetate decreases antioxidant defenses and total protein sulfhydryl content in striatum of rats. *Neurochem Res* 33:1804-10, 2008.